

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE
REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA OLUŞTURULAN
MEDULLA SPİNALİS TRAVMA MODELİNDE
AKTİVE PROTEİN C'NİN NÖROPROTEKTİF
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. EBRU POLAT

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE
REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA OLUŞTURULAN
MEDULLA SPİNALİS TRAVMA MODELİNDE
AKTİVE PROTEİN C'NİN NÖROPROTEKTİF
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. EBRU POLAT

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Atalay Arkan

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
GRAFİK LİSTESİ	v
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET	1
SUMMARY	3
GİRİŞ VE AMAÇ	5
GENEL BİLGİLER.....	7
I. SPİNAL KORD TRAVMASININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE TARİHÇESİ	7
II. SPİNAL KORD EMBRİYOLOJİSİ VE ANATOMİSİ	8
III. DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELİ.....	9
IV. SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASAR MEKANİZMALARI.....	10
IV.1. Primer Hasar Mekanizmaları.....	11
IV.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları.....	11
V. SPİNAL KORD HASARI SONRASI OLUŞAN PATOLOJİK DEĞİŞİKLİLER	14
<i>DeneySEL Spinal Kord Travması Sonrası Dejeneratif Proçesler</i>	16

<i>İnsan Spinal Kord Hasarının Deneysel Modeller İle</i>	
<i>Benzerlikleri ve Farkları</i>	17
VI. RATLARDA SPİNAL KORD ANATOMİSİ	18
VI.1. Vertebral Kolon	18
VI 2. Spinal Kord	18
VI.3. Meninksler	18
VI.4. Gri cevher	19
VI.5. Beyaz cevher	19
VII. SPİNAL KORD TRAVMALARINDA MEDİKAL TEDAVİLER	19
VII.1. Akut Tedaviler	19
VII.2. Kronik Tedaviler	19
VIII. AKTİVE PROTEİN C	20
VIII.1. APC'nin antikoagulan etkisi	22
VIII.2. APC'nin profibrinolitik etkisi	22
VIII.3. APC'nin antiinflamatuvar etkisi	22
VIII.4. Antiapoptotik etkisi	23
<i>Aktive Drotrekogin Alfa</i>	24
IX. BASSO, BEATTIE, BRESNAHAN (BBB) DAVRANIŞ TESTİ	25
<i>BBB Davranış Skoruması</i>	25
GEREÇ VE YÖNTEM	27
Deneklerin türü, bakım yeri ve koşulları	27
Çalışma dışı bırakılma kriterleri	27
Ratlarda spinal travma oluşturulması	27
Çalışma grupları	28

Davranış testleri ve fonksiyonel kayıpların incelenmesi	28
Histopatolojik İnceleme.....	29
İstatistik	29
Deney protokolümüzün şematik görünümü	30
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA	39
SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	44
EK 1: ETİK KURUL İZİN BELGESİ	53

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim hocalarım; Sayın Prof. Dr. Zahide Elar'a, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli'ye, Sayın Prof. Dr. Erol Gökel'e, Sayın Prof. Dr. Semih Küçükgülü'ye, Sayın Prof. Dr. Sermin Öztekin'e, eğitimime katkıda bulunan bölümümüzün tüm öğretim üyeleri ve uzmanlarına,

Uzmanlık tezimin her aşamasında; büyük emek, titizlikle ve sabırla bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Atalay Arkan'a,

Sıkıntılı her anımda yanımda olan, yönlendiren ve bir ağabey gibi desteğini hiç esirgemeyen tez yürütücüsü hocam Prof. Dr. Ali Necati Gökmen'e,

Tezimin deneysel uygulamasında ve yazım aşamasında; bilgi ve deneyimlerini paylaşan Prof. Dr. Osman Yılmaz, Doç. Dr. Alper Bağrıyanık, Uzm. Efsun Kolatan'a, Dr. Birol Bayraktar,

Tezimin deneysel aşamasını gerçekleştirdiğim Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına,

Dostlarım Uzm. Dr. H. Tuba Güngör, Dr. Merih Eğlen ve Dr. Hakan Baydar'a, Acısıyla tatlısıyla hayatın her yönünü paylaştığım asistan arkadaşlarıma, anestezi teknikeri dostlarıma, ameliyathane, poliklinik, yoğun bakım, ağrı hemşireleri ve çalışanlarına, birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm dostlarıma,

Gösterdikleri özveri ve anlayışıyla bana güç veren, sevgi, saygı ve hoşgörülü olmayı öğreten, ferdi olmaktan büyük onur duyduğum ailem'e,

Varlığıyla bana sonsuz mutluluk veren, yaşam kaynağım biricik kızım Ecenaz'a ve hayatım boyunca benzersiz sabrı, büyük desteği ve sevgisiyle daima yanımda olan değerli eşim Hakan'a,

En derin saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deneysel spinal kord hasar modelleri	10
Tablo 2. Sekonder hasar mekanizmaları	12
Tablo 3. İnsan ve kemiricilerde spinal kord hasarı benzerlik ve farklılıkları	17
Tablo 4. Deneklerin vücut ağırlık ortalamaları	31
Tablo 5. Zamanlara göre <i>Basso, Beattie, Bresnahan</i> skorları ortalama değerleri	32
Tablo6. Grupların nöron sayıları ortalama değerleri	34
Tablo7. Grupların glial hücre sayıları ortalama değerleri	34
Tablo 8. Grupların myelinli akson sayıları ortalama değerleri	35

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dura ve araknoid membran, subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin spinal korddan çıkışı ve ligamentum dentikulatumun anatomik görünümü	9
Şekil 2. Spinal kord sekonder yaralanma patofizyolojisi	14
Şekil 3. Ratta iskelet sistemi	18
Şekil 4. Protein C aktivasyonu ve aktive protein C aktivitelerinin şematik modelleri	21
Şekil 5. Aktive protein C'nin antiinflamatuvar aktivitesi için sitoprotektif protein C yolağı	23
Şekil 6. Aktive protein C 'nin hücre koruyucu etkisi	24

RESİM LİSTESİ

Resim 1. SF grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı görüntüsü	36
Resim 2. SF grubunda 2.denekten alınan kesitte görülen glial hücre artışı	36
Resim 3. APC 30 grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı görüntüsü	37
Resim 4. APC akut grubundan bir deneğe ait sağlam yapıda nöronların görüntüsü	37
Resim 5. APC 6 grubundan bir deneğe ait belirgin ve sağlam yapıda nöronların görüntüsü	38
Resim 6. APC 12 grubundan bir deneğe ait belirgin glial hücrelere oranla daha fazla ve sağlam yapıda nöronların görüntüsü	38

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Grupların *Basso*, *Beattie*, *Bresnahan* skorları

ortalama değerleri 33

KISALTMALAR

PC: Protein C

EPCR : Endotelyal protein C reseptörü

APC : Aktive protein C

TNF- α : Tümör nekrozis faktör α

BOS: Beyin omurilik sıvısı

Ca⁺⁺ : Kalsiyum

PNL: Polimorf nüveli lökositler

ATP: Adenozin trifosfat

NO: Nitrik oksit

PAR: Proteaz aktive reseptör (*protease activated receptor*)

NF- $\kappa\beta$: Nükleer faktör $\kappa\beta$

PAI-1: Plazminojen aktivator inhibitörü 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)

TAFI: Trombinle aktive olan fibrinolizis inhibitörü (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)

IL-1: İnterlökin 1

IL-1b: İnterlökin 1b

BBB: Basso, Beattie, Bresnahan Skorlaması

MASCIS: *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*

AE: Arka ekstremitte

ÖE: Ön ekstremitte

SF: Serum fizyolojik

MS: Medulla spinalis

GHS: Glial hücre sayısı

NS: Nöron sayısı
MAS: Miyelinli akson sayısı
MPO: Myeloperoksidaz

ÖZET

Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması

Dr. Ebru Polat, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Spinal kord travması sadece etkilenen bireyi değil, ailesini ve toplumu da ilgilendiren önemli bir sağlık problemidir ve tedavisinde ikincil hasar mekanizmalarının önlenmesinin rolü olduğu düşünülmektedir.

Amaç: Bu çalışmada deneysel spinal kord travması oluşturulan ratlarda, farklı zaman dilimlerinde intravenöz olarak uygulanan APC'nin spinal kord travmasına karşı koruyucu etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda ağırlıkları 200- 250 g arası değişen ve normal motor aktiviteye sahip 32 adet Wistar Albino türü dişi rat alındı. 2 adet rattan oluşan laminektomi grubu ve her biri 6 adet rattan oluşan 5 çalışma grubu şeklinde planlama yapıldı. Deneklere cerrahi işlem öncesi eter anestezisi uygulandı. **Grup L (n: 2):** Laminektomi uygulandı. **Grup APC 30 (n: 6):** Tek doz intravenöz 100 µg/kg APC verildi ve 30 dk sonra spinal kord travması oluşturuldu. **Grup SF (n:6):** Spinal kord travması oluşturulduktan hemen sonra intravenöz 1 mL SF verildi. **Grup APC akut (n: 6):** Spinal kord travması oluşturulduktan hemen sonra intravenöz tek doz 100 µg/kg APC verildi. **Grup APC 6 (n: 6):** Spinal kord travması oluşturulduktan 6 saat sonra intravenöz tek doz 100 µg/kg APC verildi. **Grup APC 12 (n: 6):** spinal kord travması oluşturulduktan 12 saat sonra sonra intravenöz tek doz 100 µg/kg APC verildi. Spinal kord travması, 63 gramlık kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klipi (*Aesculap* FE 721 K) dura ve spinal kordu çepeçevre saracak şekilde bir dakika süreyle kliplenerek gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrasında tüm deneklerin

fonksiyonel iyileşmeleri 1., 3., 5., 7., 14., 21., 28., ve 35. günlerde BBB lökomotor skorlama ile değerlendirildi ve 35. gün sonunda denekler sakrifiye edilerek travma alanından alınan örnekler histopatolojik değerlendirmeye alındı.

Sonuç: Nörodavranışsal testlerin sonuçları karşılaştırıldığında APC uygulanan gruplarda SF grubuna göre 28. ve 35. günlerde anlamlı iyileşme olduğu gözlemlendi. Histopatolojik olarak yapılan değerlendirmelerde myelinli akson sayısı ve nöron sayısı açısından APC uygulanan gruplarda SF grubuna göre anlamlı yükseklik gözlenirken glial hücre sayısı açısından SF grubunda diğer gruplara göre anlamlı yükseklik bulundu.

Sonuç olarak; APC'nin uzun dönemde motor fonksiyonlarda düzelme sağladığını, nöron ve miyelinli aksonları koruduğunu, glial hücre oluşumunu azalttığını saptadık.

Anahtar kelimeler: Spinal kord travması, Aktive protein C, BBB skorlaması, klip kompresyon

SUMMARY

Investigation Of Neuroprotective Efficacy Of Activated Protein C

Experimental Spinal Cord Injury

Dr. Ebru Polat, Dokuz Eylul University, School of Medicine,

Department of Anesthesiology and Reanimation, IZMIR.

Spinal cord injury is a major health problem which does not only affect individuals, but also concerning the families and communities. Prevention of secondary injury mechanisms are thought to play a role in the treatment of the diseases.

Objective: In this study, we aimed to investigate the protective effect of different periodically applied intravenous (iv) APC on rats whose spinal cord experimentally injured.

Material-Method: In our study, 32 Wistar Albino female rats weighing between 200-250 and having normal motor activity were included. A laminectomy group having two rats and five study groups having were six rats were planned. Before surgery ether anesthesia were applied to the rats. **Group L (n: 2):** Laminectomy was applied. **Group APC 30 (n: 6):** Single dose İV 100 µg/kg APC has injected and after 30 minutes spinal cord injury was induced. **Group SF (n:6):** Just after spinal cord injury has been induced, İV 1 mL %0,9 NaCl was injected. **Group APC acut (n: 6):** After spinal cord injury has been induced single dose İV 100 µg/kg APC was injected. **Group APC 6 (n: 6):** Six hours after spinal cord injury has been induced single dose İV 100 µg/kg APC was injected. **Group APC 12 (n: 6):** Twelve hours after spinal cord injury has been induced single dose İV 100 µg/kg APC was injected. Spinal cord injury was induced bandaging dura and spinal cord with Yasargil aneurysm clip (Aesculap FE 721 K) which applies 63 grams force. In order to evaluate the

functional recovery BBB locomotive rating scale were done at 3., 5., 7., 14., 21., 28., and 35 days on all rats following surgical procedures and at the end of the 35 th days, samples taken from sacrificed subjects were evaluated histopathologically.

Results: We have observed significant recovery on APC group as compared to the SF group at 28 and 35 days based on the results of locomotor activity tests. We have observed significant increase in the number of myelinated axons and neurons on APC groups as compared to the SF group, meanwhile in SF group we found out significant increase in glial cell numbers.

Keywords: Spinal cord trauma, Activated protein C, BBB score, clip compression model

GİRİŞ VE AMAÇ

Spinal kord travması; bireyin ve ailesinin yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir durumdur (1). Dünyada çeşitli ülkelerdeki spinal kord yaralanmasının yıllık insidansı milyonda 15-40 arasında görülmektedir. Spinal kord travmasının şiddetine göre geçici ve hafif nörolojik kayıptan tam ve kalıcı hasara kadar uzayan yaralanmalar ortaya çıkar. Spinal kordun komplet hasarlanmasında; zedelenen spinal kord seviyesinin altında total motor ve duysal fonksiyon kaybı saptanırken, inkomplet hasarda lezyon altında motor veya duysal fonksiyonların bir kısmının korunması söz konusudur (2).

Günümüzde spinal kord travmasından sonraki ilk 8 saat içinde uygulanan metilprednizolonun en yararlı tedavi seçenekleri içinde gösterilmiş olmasına rağmen sonuçları tartışmalıdır (3).

Travmatik spinal kord yaralanmasında nörolojik fonksiyonların geri dönüşünü sağlayacak yeni bir tedavi seçeneğinin bulunması mortalite ve morbiditenin azalmasını sağlayabilir (3). Spinal kord travmasında bugüne kadar GM-1 gangliozide (Sygen), nalokson, tirotiropin salgılatıcı hormon, nimodipin, tirilazad mesilat gibi pek çok farmakolojik ajan denenmesine rağmen klinik çalışmalarda yararları gösterilememiştir. Ancak yeni nöroprotektif ajanlar içinde minosiklin ve eritropoetin ile ilgili çalışmalar ümit vericidir (4).

Travma sonrası spinal kord yaralanmasının yalnızca primer mekanik hasara değil, sekonder patofizyolojik değişikliklere bağlı olduğu bilinmektedir (5). Primer hasarın tıbbi ya da cerrahi tedavisi bulunmamaktadır, ancak sekonder değişikliklerin oluşumunun mekanizmalarını anlamak ve engellemek teorik olarak mümkün gözükmektedir (6). Günümüzde akut spinal kord travmasının tedavisi özellikle hasar sonrası sekonder patofizyolojik mekanizmalarla oluşan hasarın azaltılmasına odaklanmıştır (7). Temel mekanik hasarı izleyen sekonder hasarda, hasarlı bölgeye lökosit girişinin artması ve oluşan inflamasyonun rolünün büyük olduğu bilinmektedir. Lökosit aktivasyonu sonucu, oksidatif aktivite artışı, fagositoz ve migrasyon hareketi oluşmaktadır (8).

Protein C (PC) hepatositlerde K vitaminine bağımlı olarak üretilen bir serin proteazı olup dolaşımda inaktif formda bulunmaktadır. Çeşitli proinflamatuvar olaylar

sonucu endotel hücrelerinde oluşan trombin-trombomodülin kompleksi endotelial protein C reseptörü (EPCR) varlığında PC'yi aktif formuna dönüştürerek, aktive protein C (APC) oluşmasına neden olur (9). APC; antitrombotik, profibrinolitik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklere sahiptir (10). Daha önce yapılan çalışmada *Murakami ve ark.* (11) APC'nin; monositlerden tümör nekrozis faktör α (TNF- α) üretimini inhibe ederek nötrofillerin aktivasyonunu engellediğini ve sonuç olarak endotelial hücre hasarını önlediğini göstermişlerdir.

Taoka ve ark. (12), ratlarda ağırlık düşürme tekniğiyle deneysel spinal kord hasarı oluşturdukları çalışmalarında APC'nin travmaya bağlı oluşan spinal kord hasarının sekonder etkilerini önleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda deneysel spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda, farklı zaman dilimlerinde intravenöz olarak uygulanan APC'nin spinal kord travmasına karşı koruyucu etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER:

I. SPİNAL KORD TRAVMASININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE TARİHÇESİ

Akut spinal kord travması, toplumu fiziksel, psikososyal ve ekonomik açıdan derinden etkileyen, ciddi ve harap edici bir nörolojik problem olması ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün hala bulunmaması nedeniyle önemini devam ettirmektedir (13). Spinal kord travmasının başlıca nedenleri arasında motorlu taşıt kazaları, spor yaralanmaları, iş kazaları, düşmeler ve şiddete uğrama sayılabilir (14). ABD'de her yıl 12000 yeni tetrapleji ve quadripleji olgusuyla karşılaşılmakta ve yaklaşık 4000 olgu hastaneye ulaşmadan, 1000 olgu ise hastanedeki izleminde kaybedilmektedir. Ülkemizde Karacan ve ark. (15) tarafından 1992 yılında yapılan çalışmada spinal kord hasarı insidansı milyonda 12.7 olarak bulunmuş ve aynı çalışmada erkek/kadın oranı; 2.5/1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada spinal kord travmasına uğrayan hastalarda tetrapleji gelişme oranı % 32.18, parapleji gelişme oranı ise % 67.18 olarak bildirilmektedir.

Spinal kord hasarı ve diğer hastalıklarının tanı ve tedavisi ile ilgili çalışmalar antik döneme kadar uzanmaktadır (16). Spinal kord travması ile ilgili ilk yazılara M.Ö 3000-2500 yılları arasında Mısırlı cerrahlarca yazılan *Edwin Smith Papirüs*'de rastlanmaktadır(17). Hipokratta yaklaşık M.Ö 400 yıllarında paraplejiyi tarif etmiş ve sonraki yıllarda *Aulus Cornelius Celcius* tarafından bildirilen bir traksiyon cihazı geliştirilmiştir (18). Ancak spinal kordun fizyolojik fonksiyonunu açıklamaktan çok, travma sonrası oluşan spinal kord deformatelerinin düzeltilmesi amacıyla traksiyon uygulamasının yapılmasını önermiştir (19). *Galen* (20) ise deneysel olarak kesilen medulla segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu bildirmiştir.

II. SPİNAL KORD EMBRİYOLOJİSİ VE ANATOMİSİ

Sinir sistemi embriyonik dönemin 3. haftasında ektodermin kalınlaşmasıyla gelişir. Ektoderm altında yer alan notokord ve mezodermin indüklenmesiyle oluşan nöral plaktan nöral tüp ve krista nöralis gelişir (21).

Nöral tüp merkezi sinir sistemine, krista nöralis de periferik sinir sistemine farklılaşır (21). Spinal kord, vertebral kanalın üst 2/3'ünü kaplayan santral sinir sisteminin bir bölümüdür. Ortalama uzunluğu erkeklerde 45 cm, kadınlarda 42-43 cm, ağırlığı ise yaklaşık 30 gr dır. Spinal kord atlas'ın üst kenarı ile L1- L2 vertebra arasında uzanır (22).

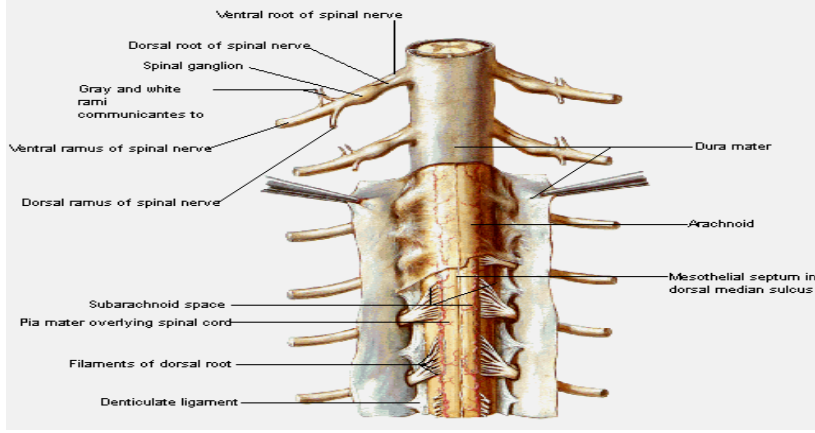
Spinal kord dıştan içe doğru dura, araknoid ve pia olarak adlandırılan membranlarla örtülüdür. Dura ve araknoid zarlar arasında subdural aralık yer alır. Araknoid ve pia zarlarını, biraz daha geniş olan ve beyin omurilik sıvısı(BOS) içeren subaraknoid aralık ayırır(22).

Spinal korddan 31 çift sinir çıkar. 8 servikal, 12 torasik, 5 lumbal, 5 sakral, 1 koksigeal spinal sinir çifti bulunur(22).

Spinal kordun transvers kesiti incelendiğinde gri ve beyaz maddeden oluştuğu görülmektedir.

Gri madde (*substantia grisea centralis*): Gri madde simetrik iki bölüm içerir. Bunlar çıplak gözle görülebilen santral kanalın içinden geçtiği transvers komissür tarafından birleştirilir. Anterior, posterior kolonlar olarak bölümlere ayırır(22).

Ak madde (*substansia alba*): Ak madde süngerimsi bir nöroglia ağının içine gömülmüş olan sinir hücrelerinden oluşmuştur. Anterior, posterior ve lateral olmak üzere 3 funikulusa ayrılır(22).



Şekil 1. Dura ve araknoid membran, subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin spinal korddan çıkışı ve ligamentum dentikulatumun anatomik görünümü (22).

III. DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELİ

Günümüze kadar insan spinal kord travmasını taklit edebilecek, tanı ve tedavide gelişmeler sağlanmasında yardımcı olabilecek birçok deneysel spinal kord travma modeli geliştirilmiştir. *Allen* 1911 yılında yüksekte spinal kord üzerine ağırlık düşürerek deneysel spinal kord travması oluşturmuştur. *Tarlov* 1953'te epidural aralıkta balon şişirerek spinal hasarı oluşturmuştur(23). 1978 yılında *Tator ve Rivlin* (24) klip kompresyon modelini uygulamışlardır. Bu modelde klip kapanma gücü değiştirilerek istenen şiddette hasar oluşturulmuştur. Bu deneysel modelde spinal kordun tamamına travma uygulanabilmesi ve kan akımının kesilmesine bağlı iskemi oluşması insanlarda meydana gelen travma sonrası spinal kord hasarına benzerlik sağlamaktadır (5). Ağırlık düşürme modelinde kinetik enerjinin tamamı spinal korda aktarılamamaktadır. Cismin sürtünmesi, çevre dokulara enerji dağılımı, spinal korda birden çok kere çarpması, spinal kordun farklı hayvanlarda farklı segmentlerde farklı çapa, kan akımına ve BOS dolaşımına sahip olması ağırlık düşürme yönteminin dezavantajlarıdır(23). Diğer deneysel modeller içinde, nöronal hücre kültürleri ya da spinal kordun anatomik olarak intakt kesitleri, fotokimyasal veya termal hasar, germe kuvvetleri veya piston travma gibi çeşitli mekanik veya iskemik hasar oluşturulması sayılabilir (25).

Tablo 1. Deneysel omurilik hasar modelleri (23)

-
- A) Travmatik hasar
- 1- Akut Kinetik Kompresyon – kaf, klip, balon, vertebral dislokasyon, *impactor*.
 - 2- Akut Statik Kompresyon –ağırlık uygulanması
 - 3- Ağırlık Düşürme
 - 4- Akselerasyon-Deselerasyon
 - 5- Distraksiyon
 - 6- Transeksiyon-parsiyel, tam, lazer, bistüri
-

- B) Non-travmatik hasar
- 1- İskemi-aort oklüzyonu, selektif arter veya ven oklüzyonu
 - 2-Tümör kompresyonu
 - 3- Kimyasal
-

IV. SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASAR MEKANİZMALARI

Hasar sonrasındaki ilk birkaç gün içerisinde, spinal kordda oluşan lezyonun patolojik görüntüsündeki dramatik değişiklikler, klinik ve deneysel gözlemlerin en önemli noktasını oluşturmaktadır (26). Bununla bağlantılı olarak, spinal kord travmasının patofizyolojisinde oluşan hasarın primer ve sekonder mekanizmalarla olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bunlar; birincil mekanik hasar ve bunun tarafından tetiklenerek oluşan ve birçok etkenin rol oynadığı sekonder hasarlanma konseptidir (5).

1. Primer Hasar Mekanizmaları

Spinal korda darbe olduğu ilk anda nöron ve aksonlarda oluşan mekanik hasardır. Travmanın spinal kord veya çevresindeki vertebral kolona uyguladığı güce bağlı olarak gelişir (27).

Spinal kord içindeki kanama, mekanik hasar sonrası erken dönemde ortaya çıkarken, kan akımının kesintiye uğraması daha geç meydana gelir. Kan akımının kesilmesi hipoksi ve iskemi ile birlikte lokal enfarkt oluşmasını sağlar. Bu özellikle yüksek metabolik gereksinimi olan gri cevherin hasarlanmasına yol açar. Hasarlanan alandan geçen nöronlar fiziksel olarak kesintiye uğrar ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Gelişen ödem ve makrofajlar da sinir iletilisinin bozulmasına katkıda bulunur (28). Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşümsüz hasarının ilk saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat içerisinde geri dönüşsüz hasarlandığı düşünülmektedir (29).

2. Sekonder Hasar Mekanizmaları

Sekonder omurilik hasar teorisi ilk kez 1911'de *Allen* tarafından ileri sürülmüştür (24). Primer mekanik hasar daha sonra hasarlanmanın büyümesine neden olacak sekonder mekanizmaların oluşmasında çekirdek işlevi görür. Sekonder hasar mekanizmaları; nörojenik şok, kanama ve iskemi-reperfüzyona bağlı problemler, eksitotoksitite, kalsiyumla (Ca^{++}) ilişkili sekonder hasar, sıvı elektrolit dengesizliği, immünolojik hasar, apoptoz ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu içermektedir. Sekonder hasarın meydana gelmesine neden olan mekanizmalar sistemik ve lokal etkiler olmak üzere iki kısımda incelenir (30).

Tablo 2. Sekonder hasar mekanizmaları (26)

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi
Kan basıncında kısa süreli artış, sonra uzun süreli hipotansiyon
Periferik dirençte ve kardiyak debide azalma

Omurilik Dolaşımında Lokal Vasküler Hasar

Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
Özellikle gri cevherde hemoraji
Mikrodolaşımda kayıp-mekanik, tromboz,vazospazm

Biyokimyasal Değişiklikler

Eksitotoksiste-glutamat
Nörotransmitter birikimi
Ketakolaminler-noradrenalin, dopamin
Araşidonik asit salınması
Serbest radikal üretimi
Eikozanoid üretimi
Prostaglandinler
Lipid peroksidasyonu
Endojen opioidler

Elektrolit Kaymaları

Hücre içi Ca^{++} ve sodyumda artış
Hücre dışı potasyumda artış

Yangısal Yanıt

Serbest radikal üretimi
Makrofajlar
Aksonal yıkım, miyelin artıklarının salınımı
Sitokinlerin salınması
Glial hücre aktivasyonu
Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler
Wallerian dejenerasyon

Ödem

Apoptoz

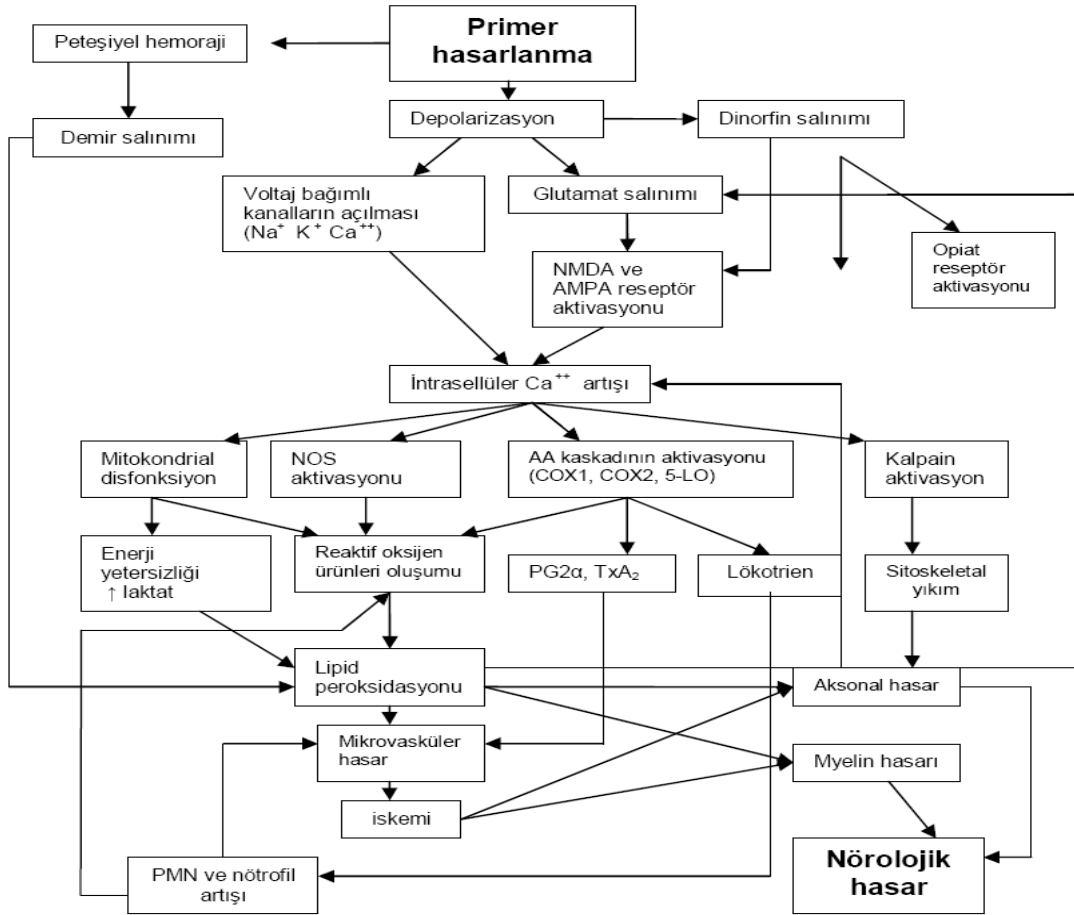
Enerji metabolizmasında kayıp (ATP üretiminde azalma)

a.Sistemik etkiler

Akut omurilik hasarının sistemik etkileri; nörojenik şok ve solunum yetmezliğidir (30). Oluşan nörojenik şokun derecesi meydana gelen omurilik hasarının seviyesi ile ilişkilidir (31). Spinal kordun travmatik hasarı sonucunda spinal kord otonöregülasyonunun kaybolması ve sistemik hipotansiyon oluşması posttravmatik iskemiye şiddetlendirir (5).

b. Lokal etkiler

Akut spinal kord travmasının başlangıcında ve sonrasında çeşitli mekanizmaların oluşturduğu etkilerle, omurilik üzerinde vasküler hasara bağlı ciddi değişiklikler oluşmaktadır. Bu vasküler hasar hemorajik ve iskemik hasarlanmayı da beraberinde getirmektedir(28). Başlangıçta mekanik travma ile venül ve kapiller damarlarda oluşan yaralanma, mikrosirkülasyonun bozulmasına ve spinal kord hasarının rostral-kaudal yayılmasına neden olur (32).



Şekil 2. Spinal kord sekonder yaralanma patofizyolojisi(33)

V. SPİNAL KORD HASARI SONRASI OLUŞAN PATOLOJİK DEĞİŞİKLİLER

Travma spinal kordda akut, subakut ve kronik değişiklikler meydana getirir.

Akut dönemde şiddetli darbe sonrası ilk bir kaç dakika içinde spinal kordun kabaca görünümü ve histolojisi normaldir. Işık ve elektron mikroskopi ile 5. dakikada aksonların normal olduğu, gri cevherdeki venüllerin şiştiği, 15 -30. dakikada eritrositlerin kapiller ve venüllerin etrafına sızdığı görülmüştür. Gri cevherde gözlenen peteşiyal kanamalar bir kaç saat içinde beyaz cevherde de belirir. Yaralanmadan 2 saat sonra mikroglia ve polimorfonükleer lökositler (PNL) gibi inflamatuvar hücrelerin invazyonu başlar, 4. saatte miyelin kılıfları yırtılır ve aksonlar dejenere olur, 6. saatte

vazojenik ödem gelişir. Travma sonrası 12-24. saatlerde spinal kordun santral bölgesi normal görünümünü kaybeder. 24-48. saatte santral hemoraji bölgelerinde nekroz oluşur. Bu dönemde gri ve beyaz cevher ayrımı yapılamaz. Akut dönemde lezyon bölgesinde görülen PNL yerini sonraki günlerde makrofajlar alır. Bir hafta sonunda nekrotik alanların kistik dejenerasyonu belirginleşir (34).

Uygun tedavi yapılmaz ise hasarlanmış nöral ve endotelial dokulardaki hücre ölümü hızla gelişir (35).

Ara dönem spinal kord hasarından dakikalar ile haftalar sonra gelişir. Hipoksiyi izleyen vasküler yaralanma, Adenozin trifosfat (ATP) yetersizliği, hücre içine Ca^{++} girişi sonucu gelişen eksitotoksitite ve serbest radikal üretiminin neden olduğu lipid peroksidasyonu sekonder olayların neden olduğu hasarı artırır. Subakut fazda aktive olmuş mikroglia ve astrositlerin reaktif gliozisi oluşturduğu tespit edilmiştir. Mikroglialının nöronal dejenerasyon varlığında kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüştüğü gösterilmiştir. İnflamatuvar hücrelerin yaralı spinal korda göç ederek sitotoksik etkileri ile nöronofaji yapabildikleri belirtilmiştir (36). Ayrıca apoptoz ve oluşan inflamatuvar reaksiyonlar hasarın artmasına neden olur.

Travmatik hasar sonucu astrositlerden ortama salınan ATP, pürin reseptörlerine bağlanarak nöronlardaki iyon kanallarının açılmasına neden olur. Spinal kord travması oluşturan ratlarda pürin reseptörleri geçici bloke edilmesiyle, hasar bölgesinde hücre ölümünde azalma ve belirgin fonksiyonel iyileşme saptanmıştır (37).

Kronik dönem, spinal kord yaralanmasından günler sonra başlar ve yıllarca sürebilir. Bu dönem spinal kord hücrelerinin apoptozu ve demyelinizasyonu ile karakterizedir (35). Spinal kordda yara iyileşmesinin kistik kavite oluşması ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Guizar-Shagun ve ark. (38) spinal kord yaralanması sonrası kist gelişmesinde üç evre olduğunu bildirmişlerdir.

Nekroz evresi: 1. gün başlar.

Tamir evresi: Travmadan sonraki 2. ve 8. haftalar arasındadır.

Stabilizasyon evresi: Lezyondan sonraki 8. haftadan 1. yıla kadar değişir.

Deneysel Spinal Kord Travması Sonrası Dejeneratif Proçesler

Spinal kord travması, hasar bölgesindeki nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve endotelial hücrelerin ölümüne neden olur. Gerilen aksonların özellikle kalın myelinli olanları membran hasarına uğrar (39). Bunu ilerleyici akson hasarı izler. Ayrıca lokal kan damarlarındaki endotelial hücrelerin ölümü kanama ile sonuçlanır. Böylece hasarlanan bölge ve çevresine oksijen ve beslenme desteği sağlanamaz. Hasarın akut fazında lezyon ve çevresindeki parankime nötrofil infiltrasyonu ile birlikte kompleman aktivasyonu gelişir(40, 41). Vasküler hasar ve inflamasyona bağlı olarak spinal kordda ödem oluşur. Hemorajik bölge başlangıçta yüksek derecede vaskülarize gri cevherle sınırlı iken dakikalar ve saatler içerisinde beyaz cevherin, rostral-kaudal bölgelerine yayılır. Bu yayılma, hasara sekonder olarak subakut fazda hatta bazen kronik fazda yıllarca sürebilir. Devam eden hücre ölümü ile birlikte hücre dışı sıvıda glutamat gibi aminoasitler artarak eksitotoksisteye neden olur(42).

Birçok lokal ve uzak mikroglia hücresi yaralanmadan sonra aktive olur ve aktivasyon süreci dört haftayı geçmez (43).

Lipid peroksidasyonu ve serbest radikal oluşumu yakındaki sinir dokusunun hasarına katkıda bulunmaktadır. Eksitator aminoasitlerin indüklediği Ca^{++} girişi, enerji yetmezliği, nitrik oksit üretimi oksidatif stres ve membran hasarı gibi birçok mekanizma hasarın başlangıcındaki hücre ölümüne neden olabilir (44).

İlk hafta monositler, makrofajlar ve T lenfositler hasarlı bölgeye hareket eder (45). Sinir dokusunda makrofaj ve lenfositlerin geliştirdiği hasar şiddetlidir (46). Oligodendrositler ise apoptozis sonucu ölür. Sekonder fazda skar oluşumunda rolü olan meningeal fibroblastlar ve astrositler tarafından ekstraselüler aksonal büyüme inhibitörü proteoglikanlar salgınır.

Kronik faz ise spinal kordun atrofisiyle sonuçlanır. Apoptotik hücre ölümü hasarın uzağında halen devam etmektedir. Oligodendrositler yok olsa da demyelinizasyon uzun süreler devam eder. Skar dokusu hasar bölgesinin çevresinde kalır. Dokuların kaybı ve temizliği, içi sıvı dolu kistlerin oluşumuna neden olur. Bazı

hücreler ve moleküller sinir dokusunu koruma ve tamir görevi üstlenir ancak yine de motor ve sensoriyal sistemleri içeren birçok dokuda fonksiyon kaybı gelişir (43).

İnsan Spinal Kord Hasarının Deneysel Modeller İle Benzerlikleri ve Farkları

İnsanlarda ve kemiricilerde spinal kord hasarındaki morfolojik değişiklikler birbirine benzemektedir. İnsanlarda inflamatuvar komponent daha az etkilidir. Ratlarda spinal kontüzyonda sitokinlerin hızlı artışı insanlarla benzerdir (47). İnsanlarda ratlara göre astroglial yanıt belirgin şekilde azalmış ve gecikmiş olup ılımlı bir astroglial skar gelişir (48). Spinal kord hasarında Schwann hücre yanıtı insanlarda sık kemiricilerde ise daha az sıklıkta görülür.

Spinal kord hasarında yanıtları ve yeni tedavileri değerlendirmek için birçok deneysel model geliştirilmiştir. Kontüzyon modeli, insanlardaki hasara en yakın spinal kord hasarı gibi görünmektedir (43).

Tablo 3. İnsan ve kemiricilerde spinal kord hasarı benzerlik ve farklılıkları (43).

Dejeneratif süreçler	Kemirici	İnsan
Vasküler yanıt	Hemoraji, anjiogenezis	Hemoraji, anjiogenezis
İnflamasyon	Aşırı	Daha az
Demyelinizasyon	Evet	Evet (daha az oranda)
Aksonal dejenerasyon	<i>Wallerian</i> dejenerasyon	<i>Wallerian</i> dejenerasyon (daha belirgin)
Gliyal skar	Aşırı	Aşırı değil
Kist oluşumu	Rat evet; fare hayır	Evet
<i>Schwann</i> hücre yanıtı	Az oranda invazyon	Aşırı invazyon
Rejeneratif süreçler		
Sinir liflerinde filizlenme	Evet	Evet
Remyelinizasyon	Evet	Evet
Zarar görmeyen sinir liflerinin uyumu	Evet	Evet

VI. RATLARDA SPİNAL KORD ANATOMİSİ

1. Vertebral Kolon

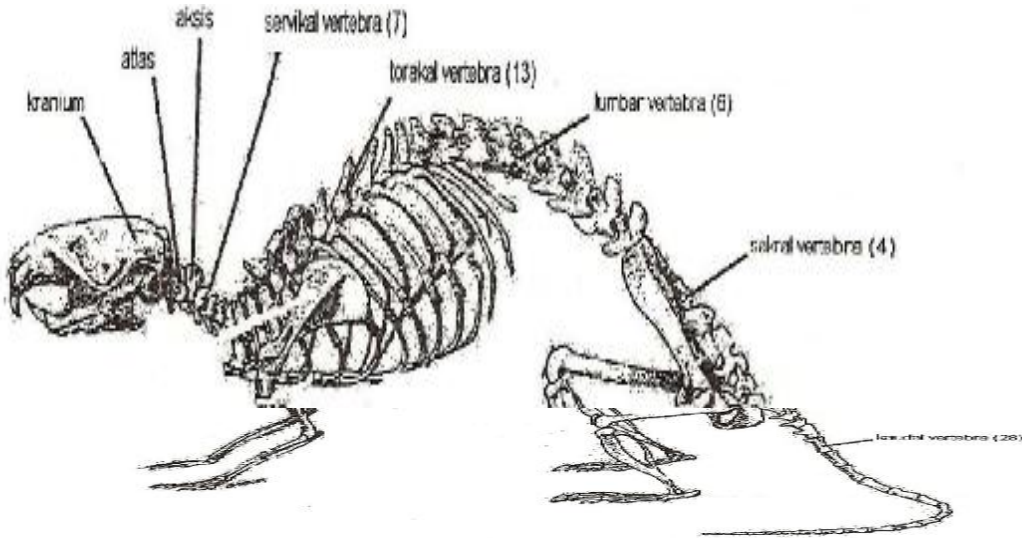
Kraniyalden kaudale doğru 7 adet servikal, 13 adet torakal, 6 adet lumbar, 4 adet sakral, 28 adet kaudal olmak üzere 58 adet vertebradan oluşmaktadır.

2. Spinal Kord

Kraniyalde medulla oblongatanın devamı olarak başlar. Nöral kanal içinden geçer ve ince filamentlerle (*filum terminale*) sonlanır. Servikal ve lumbar alanlarda çıkan sinirlerin olduğu genişlemeler vardır (49).

3. Meninksler

Beyini saran meninkslerin devamıdır. En dışta dura mater, ortada araknoid ve içte pia mater yer alır. Araknoid ve pia mater serebrospinal sıvıyı içeren subaraknoid boşlukla ayrılır.



Şekil 3. Ratta iskelet sistemi (49)

4. Gri cevher

Spinal kordun merkezinde sinir dokusunun H şeklindeki kitlesidir. İki ventral kolu anterior gri boynuz, iki dorsal kolu posterior gri boynuz, daha küçük lateral yansımaları lateral gri boynuzlar olarak adlandırılır. Merkezindeki küçük boşluk santral kanaldır. Gri madde destek doku ve nöron hücre cisimciklerinden oluşur. Fonksiyonel olarak ventral taraf motor ve dorsal taraf duyuşal sinir liflerini içermektedir(49).

5. Beyaz cevher:

Gri cevheri çevreleyen sinir dokusudur. Duyusal liflerin asendan yolunu ve motor liflerin desendan yolunu birleştirir. Spinal kord kesitlerinde bir ventral, bir dorsal ve iki lateral olmak üzere dört kolon olarak gözlenir(49).

VII. SPİNAL KORD TRAVMALARINDA MEDİKAL TEDAVİLER (50)

1. Akut tedaviler

Akut tedaviler nöroprotektif ilaçları içerir ve dört gruba ayrılır:

- Antioksidanlar,
- Nörotransmitter reseptör blokerleri,
- Fosfokinaz stimulatörleri,
- Fosfataz inhibitörleri

2. Kronik tedaviler

Rejenerasyon ve remiyelinizasyon yoluyla fonksiyonların iyileşmesini sağlar. İyileştirici tedavi üç kategoride incelenir:

- Büyüme ve büyümeyi inhibe eden faktör blokerleri,
- İntraselüler haberci modülatörler,
- Nakledilebilen hücreler veya materyaller

Omurilik Hasarında Potansiyel Olarak Etkili Olabilecek İlaçlar (50).

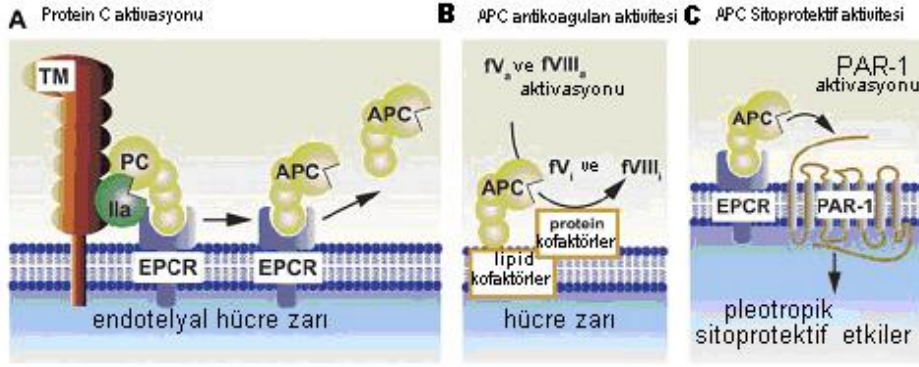
- 1- Metilprednizolon
- 2- Gangliozid (Gm-1)
- 3- Larazoidler (trilazad mesilat)
- 4- Opiyat antagonistleri (naloksan)
- 5- Eksitatör aminoasit antagonistleri
- 6- Kalsiyum kanal blokerleri
- 7- Potasyum kanal blokerleri
- 8- Serbest radikal tutucuları
- 9- Antiinflamatuvar ajanlar
- 10- Nörotransmitter reseptör agonistleri
- 11-Nörotropik faktörler
- 12-Fetal doku transplantasyonu
- 13-Nötralizan antikorlar
- 14-Melatonin
- 15-Hiperbarik oksijen
- 16-Sistemik hipotermi
- 17-Minosiklin
- 18-Eritropoetin

VIII. AKTİVE PROTEİN C

Protein C karaciğerde K vitaminine bağımlı olarak üretilen bir serin proteazı olup dolaşımında inaktif formda bulunmaktadır. Çeşitli proinflamatuvar olaylar sonucunda endotel hücrelerinde oluşan trombin-trombomodülin kompleksi EPCR reseptörü varlığında PC'yi aktif formuna dönüştürerek APC oluşumunu sağlar (9) (şekil 4 A).

Aktive protein C; antitrombotik, profibrinolitik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklere sahip bir moleküldür (10).

Aktive protein C'nin hücreler üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmasa da; antikoagulan aktivitesi ve ilişkili kanama riskini yöneten yapısal özellikleri, sitoprotektif aktivite özelliklerinden farklıdır (51)



Şekil 4. Protein C aktivasyonu ve aktive protein C aktivitelerinin şematik modelleri (51)

Protein C yolunun inflamasyon ve koagulasyon sistemleri arasında önemli bir bağlantı oluşturduğu hipotezi öne sürülmüştür. 1990'lı yılların ortasında EPCR bulunmuştur. Böylece APC'nin trombin yapımını sınırlayıcı etkileri ve EPCR'ye bağlanarak ortaya çıkan hücresel etkileri olmak üzere biyolojik etkileri iki sınıfa ayrılabilir. APC'nin kendi reseptörüne bağlanmasıyla oluşan hücre içi sinyalleri komşu bir proteaz aktive reseptör1 (PAR1) veya sfingozin-1-fosfat yolunun indirekt aktivasyonu ile düzenlenir. İn vitro çalışmalara dayanarak, APC'nin endoteldeki reseptörüne bağlanmasının trombin kaynaklı endotel permeabilite hasarını azalttığı ve kan hücreleri, epitel ve nöronlardaki reseptörlere bağlanmasının ise antiapoptotik, nöroprotektif olduğu ve kemotaksisi inhibe ettiği bildirilmiştir (52). Buna ek olarak APC'nin endotel, monosit, nötrofil, eosinofil ve respiratuar epitelyum hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak direkt antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (53).

APC' nin son zamanlarda insanda sepsis ve kemirgenlerde Crohn hastalığı, diabetik nefropati, inme, tümör metastazı, Multipl Skleroz modellerini içeren çeşitli hastalıklarda koruyucu olabileceğine dikkat çekilmektedir. Bu koruyucu etkisi antikoagulan özelliğinden bağımsız, endotel hücrelerindeki EPCR ve PAR1 bağımlıdır. Nükleer faktör $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) düzeyinde azalma proinflamatuvar cevapta baskılanma ve endotel bariyer fonksiyon kaybına karşı koruyucu etkiye neden olabilir (54).

1. APC'nin antikoagülan etkisi

Trombomodulin, trombin üzerinde fibrinojenle aynı bölgeye bağlandığından trombosit ve faktör V'in tüm fonksiyonları bloke edilmiş olur. Bunun yerine trombin-trombomodulin kompleksi PC'yi aktive ederek APC yolunu başlatır (55). Bu süreç EPCR ile hızlanır. Antikoagülan etkisi özellikle mikrosirkulasyon açısından önem taşımaktadır (56).

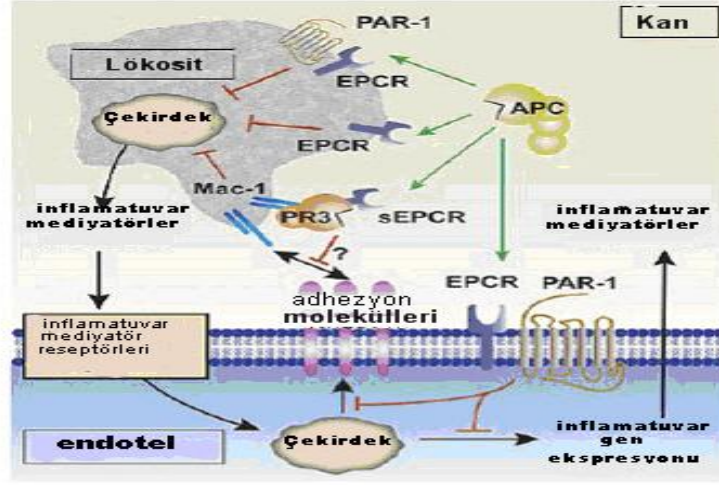
Aktive Drotrekogin alfa'nın antitrombotik etkisi ciddi sepsis hastalarında plasebo grubuyla karşılaştırıldığında D-dimer ve trombin belirteçlerinin düzeyinde azalmanın olduğu saptanarak gösterilmiştir (57). Şaşırtıcı bir şekilde diğer antikoagulanlardan farklı olarak Drotrekogin alfa düşük doz toksemili insan modelinde trombin yapım belirteçlerini çok fazla azaltmamıştır (58).

2. APC'nin profibrinolitik etkisi

Prelinik çalışmalara göre APC, doku plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)'i inhibe ederek ve trombinle aktive olan fibrinolizis inhibitörünü (TAFI) sınırlayarak endojen fibrinolitik yolu hızlandırır (59). Ancak diğer serin proteaz inhibitörlerine göre PAI-1 konsantrasyonu daha düşüktür. Bu nedenle APC'nin mikrosirkulasyonda PAI-1 üzerine etkisi minimaldir. Bu Drotrekogin alfanın sepsis hastalarında PAI-1 seviyesini plasebo grubuna göre neden fazla düşürmediğini açıklamaktadır. TAFI bir akut faz reaktanı olarak bilinir (57).

3. APC'nin antiinflamatuvar etkisi

Aktive protein C'nin antiinflamatuvar etkileri endotelial hücreler üzerine ve lökositler üzerine etkiler olarak ayrılabilir. Endotelial hücreler üzerine etkileri, inflamatuvar mediyatör salımının inhibisyonu ve vasküler adhezyon moleküllerinin *down-regülasyonunu* içerir; böylece lökosit adezyonu ve infiltrasyonunu önleyerek doku hasarını sınırlandırır (şekil 5). Aktive protein C endotelial hücrelerden olduğu kadar lökositlerden de inflamatuvar sitokin salımını inhibe eder. Bu etkisi sepsisle ilişkili olan sitokin fırtınasını azaltır (51).



Şekil 5. Aktive protein C'nin antiinflamatuvar aktivitesi için sitoprotektif protein C yolu (51)

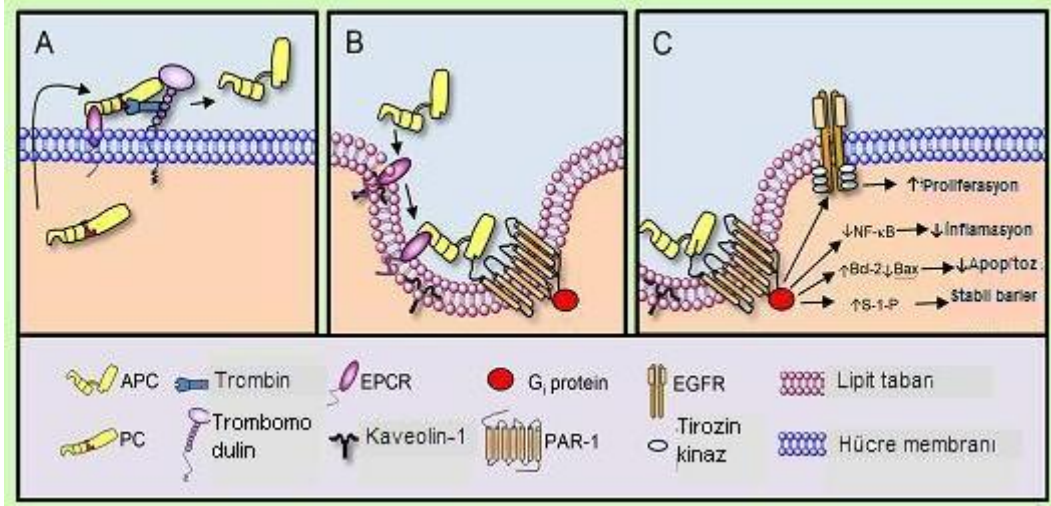
Hem hayvan çalışmalarında hem insanlarda in vivo olarak gösterilmiştir ki, APC lökositlerin sitokin salınımını, kemotaksisini ve migrasyonunu inhibe eder. Ratlarda ve insanlarda, APC endotoksin ile indüklenen pulmoner hasar ve inflamasyonu inhibe eder (11).

APC'nin interlökin 1(IL-1) ve TNF- α gibi sitokinleri azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bir çok çalışmada gösterilmiştir (60). Fakat bugüne kadar Drotrecogin alfa'nın bu şekilde klinik bir etkisi bulunamamıştır. Ağır sepsis hastaları ile yapılan bir çalışmada drotrecogin alfa verilen grupla plasebo grubu arasında TNF- α , interlökin 1b(IL-1b), interlökin 10, interlökin 8 seviyelerinde bir fark bulunamamış fakat Drotrecogin grubunda interlökin 6 seviyelerinin daha hızlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır (57).

4. Antiapoptotik etkisi

Endotelial hücrelerde APC uyarısı apoptozisi azaltır (61). APC'nin apoptotik fonksiyonu hücreler üzerindeki doğrudan etkisine bağlıdır, ancak aracılık eden reseptör tam olarak tanımlanmamıştır. Yazarlar APC'nin Nf- κ B bağımlı proinflamatuvar genlerin ekspresyonunda azaltıcı düzenlemeye yol açtığını ve staurosporinle oluşturulmuş apoptozis modelinde doğrudan antiapoptotik aktivite oluşturduğunu göstermişlerdir (62). APC'nin antiapoptotik etkilerine katkıda bulunan

mekanizmada hem A1 Bcl-2 homolog proteini, endotelial nitrik oksit sentazı, proliferasyon hücre nükleer antijenini içeren antiapoptotik gen ekspresyonlarını artırıcı düzenlemenin hem de Apo J/kluterin ve kalretikulini içeren proapoptotik genlerin ekspresyonunun azalmasının yeri vardır (63).



Şekil 6. Aktive protein C 'nin hücre koruyucu etkisi (64)

Aktive Drotrekogin Alfa

Aktive drotrekogin alfa endojen APC'nin rekombinant versiyonudur. Aktive Drotrekogin alfa (XIGRIS®) nın 5 mg ve 20 mg infüzyon solüsyonu için toz içeren flakon formları (Lilly İlaç Tic Limt Şirketi) mevcuttur.

IX. BASSO, BEATTIE, BRESNAHAN (BBB) DAVRANIŞ TESTİ

Spinal kord yaralanması sonrası gelişen davranışsal sonuçları değerlendirmek için BBB davranış testi 1995'te Basso ve ark. (65) tarafından geliştirilmiştir.

Bu skala çok merkezli hayvan spinal kord yaralanma çalışmalarında *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)* ve halen nörotravma literatüründe yaygın olarak kullanılmaktadır (66).

Öncelikle kimyasal veya cerrahi müdahaleden en erken bir gün sonra 21 puanlı skala ile lökomotor durum değerlendirilir. Test 6-9 haftaya kadar belirli aralıklarla tekrarlanır. BBB skorlaması ile; arka ayaklarda hiç hareket olmamasından (0 puan) tam vücut stabilitesi ve kuyruğun havada olmasına kadar (21 puan) çok geniş aralıklarda lökomotor hareket değerlendirilir (67). 21 puanlı bu skalada 0 ile 7 puan arası ölçümler müdahale sonrası erken dönemde arka ayakların eklem hareketleri, 8 ile 13 puan arası ara dönemde adım atma ve koordinasyon, 14 ile 21 puan arası geç dönemde parmak temizleme hareketi ve pençe rotasyonu değerlendirilir (68). BBB skalası, veriler hakkında sürekli değil ara dönemlerde bilgi verir. (69).

Spinal kord yaralanmalarında ön ve arka ayaklar arasındaki koordinasyonun değerlendirilmesinde BBB testi yetersiz kalıp, lökomotor fonksiyon yanlı olarak daha düşük tahmin edilebilir (70).

BBB Davranış Skorlaması(65)

İyileşmenin erken döneminde (Arka ekstremite hareketleri)

- 0-Gözlenebilen arka ekstremite (AE) hareketi yok
- 1-Bir veya iki eklemden hafif hareket (Genelde diz ve/veya kalça)
- 2-Bir eklemden geniş hareket veya bir eklemden geniş hareket + diğer eklemden hafif hareket
- 3-İki eklemden geniş hareket
- 4-Üç eklemden hafif hareket (AE) (Kalça,diz,ayak bileği)
- 5-İki eklemden hafif hareket+üçüncü eklemden geniş hareket
- 6-İki eklemden geniş hareket +üçüncü eklemden hafif hareket
- 7-Üç eklemden geniş hareket (AE)

II: İyileşmenin Orta Döneminde (Adım atma koordinasyonu)

8-Ağırlığını taşımadan sürünmek veya pençenin plantar yerleştirilmesi

9-Ağırlığını taşıyarak pençenin plantar yerleştirilmesi veya tek bir defa, ara sıra, sık sık , sürekli ağırlığını kaldırarak dorsal adımlama + plantar adımlama yok

10-Ara sıra ağırlığını taşıyarak plantar adımlama. Ön ekstremitte (ÖE) arka ekstremitte koordinasyonu yok

11-Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ÖE, AE koordinasyonu yok

12-Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ÖE, AE koordinasyonu mevcut

13-Sürekli ağırlığını kaldırarak plantar adımlama ve sık sık ÖE, AE koordinasyonu

III: İyileşmenin Geç Döneminde (Ayrıntılar, ince hareketler)

14-Sürekli ağırlığını taşıyarak adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu veya hareket sırasında predominant pençe pozisyonunda yuvarlanma veya sık plantar adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu, arasıra dorsal adımlama

15-Sürekli ÖE, AE koordinasyonu, parmak temizleme hareketi yok veya ekstremitenin öne ilerletilmesi ile ara sıra parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi vücuda paralel.

16-Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak

17-Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel

18-Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu ve ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sürekli parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak

19-Yürüyüş ile sürekli koordineli ÖE, AE hareketi, ekstremitenin öne hareketi ile sürekli parmağı temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel

20-Sürekli koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel; fakat gövde instabilitesi var; kuyruk sürekli havada

21-Koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme, predominant pençe pozisyonu paralel, sürekli gövde stabilitesi, kuyruk sürekli havada

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneklerin Türü, Bakım Yeri ve Koşulları

Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yetiştirilen, % 87 homojeniteye sahip, ağırlıkları 200- 250 g arası değişen ve normal motor aktiviteye sahip 32 adet Wistar Albino türü dişi rat çalışmaya alındı. Denekler standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz - 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22 °C oda ısı, % 50-60 nem) bulunduruldu. Yiyebilecekleri kadar su ve yiyecek verildi.

Çalışma Dışı Bırakılma Kriterleri

Çalışma sürecinde herhangi bir zamanda aşağıda belirtilen sorunların gözleendiği denekler çalışmadan çıkarıldı.

- İzlem sırasında enfeksiyon oluşması,
- Spinal travma oluşturulan ratlarda arka bacaklarında paralizi ve sürüklenme davranışı gözlenmeyen denekler çalışma dışı bırakıldı.

Ratlarda Spinal Travma Oluşturulması

Açık damla yöntemi ile eter anestezisi uygulanan ratlar yüzüstü pozisyonda tespit edildi. Rektal ısı probu monitorizasyonu eşliğinde, işlem süresince, vücut ısıları 37°C'de tutulacak şekilde servo kontrollü lamba ile ısıtıldı. Deneklerin interskapuler mesafe referans alınarak sırt bölgesinde 3x2 cm'lik alan traş edildi ve povidon iyot ile lokal antisepsi uygulandı. İnterskapuler mesafe referans alınarak yüz üstü pozisyonda T5-12 seviyesinde orta hat insizyonu yapıldı. Cilt, cilt altı dokular ve paravertebral kas fasyası geçilerek kaslar laterale künt disseksiyon ile sıyrıldı ve T7-10 laminaları görüldü. T7 seviyesinde total laminektomi uygulandı ve deneklerin duramaterlerinin zedelenmemesine dikkat edildi. Bu seviyede spinal cord standart travma amacıyla 63 g kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klibi (*Aesculap FE 721*

K) ile dura ve spinal kordu çepçevre saracak şekilde bir dakika süreyle klibe edildi. Daha sonra klip kaldırıldı ve hemostazı takiben insizyon sahası anatomik katlarına uygun olarak 3/0 ipek ile kapatıldı. Denekler kafeslerine yerleştirildi. Serbestçe beslenmelerine izin verilerek günde iki kez manuel kompresyon ile mesaneleri boşaltıldı.

Çalışma Grupları

Grup L (n: 2); Bu gruptaki ratlara sadece laminektomi uygulandı.

Grup APC 30 (n: 6); Bu gruptaki ratlara İV tek doz 100 µg/kg APC verildi ve 30 dk sonra spinal kord travması oluşturuldu.

Grup SF (n:6) ; Bu gruptaki ratlara spinal kord travması oluşturulduktan hemen sonra İV 1 mL serum fizyolojik (SF) verildi.

Grup APC akut (n: 6); Bu gruptaki ratlara spinal kord travması oluşturulduktan hemen sonra İV tek doz 100 µg/kg APC verildi.

Grup APC 6 (n: 6); Bu gruptaki ratlara spinal kord travması oluşturulduktan 6 saat sonra İV tek doz 100 µg/kg APC verildi.

Grup APC 12 (n: 6); Bu gruptaki ratlara spinal kord travması oluşturulduktan 12 saat sonra sonra İV tek doz 100 µg/kg APC verildi.

Cerrahi sahada gelişebilecek bir enfeksiyondan ve üriner enfeksiyondan korumak amacıyla tüm ratlara ilk 3 gün 40 mg/kg/gün sefazolin sodyum (Cefamezin, Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş, İstanbul/Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Postoperatif dönemde postoperatif ağrı tedavisi için Buprenorfin 0.02 mg/kg intramuskuler yapıldı.

İşlem sonunda paraplejik olan ratlar yemlerine kolay ulaşmasını sağlayan özel kafeslerine yerleştirildi ve serbestçe beslenmelerine izin verilerek refleks mesane gelişene günde iki kez manuel kompresyon ile mesaneleri boşaltıldı.

Davranış Testleri ve Fonksiyonel Kayıpların İncelenmesi

Deney sonrasında tüm deneklerde fonksiyon kayıplarının ve fonksiyonel iyileşmenin davranış testleri ile değerlendirilmesi tedavi grupları hakkında bilgi sahibi olmayan bir çalışmacı tarafından "*Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) behavior rating scale*" kullanılarak yapıldı (69).

Denekler fonksiyonel kayıpları yönünden spinal yaralanma oluşturulmasından hemen sonraki 24., 48., 72. saatlerde ve 1., 2., 3., 4., 5. haftalarda değerlendirildi ve fonksiyon kayıp skorları belirlendi.

Histopatolojik İnceleme

Denekler 5. haftanın sonunda davranış testleri ve fonksiyon kayıplarının değerlendirilmesi yapıldıktan sonra açık damla yöntemi ile eter anestezisi altında transkardiyak SF ve bunu izleyen %10'luk formol ile perfüze edildikten sonra sakrifiye edildiler. Spinal yaralanma bölgesi merkezde olacak şekilde 1.5 cm'lik bir medulla spinalis (MS) parçası çıkarılarak %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 48 saat süre ile fikse edildi. Yaralanma bölgesi merkezde olacak şekilde 2 mm kaudal, 4 mm rostral alan içeren kesitler uygulanarak doku takip işlemi yapıldı. Rutin histolojik doku takip sonrası parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm'lik transvers MS seri kesitler alındı. Deparafinizasyon sonrası doku değerlendirmesi için H-E boyası ile boyandı. H-E ile boyalı kesitlerden Olympus BH2 ve JVC digital kamera yardımı ile her gruba ait MS transvers kesitleri digital olarak görüntüledi. UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00 digital görüntü analiz programıyla 100 µm x 100 µm alana sahip sayım çerçevesi kullanılarak glial hücre sayısı (GHS), gri cevherde nöron sayısı (NS) ve ak cevherde de myelinli akson sayısı (MAS) hesaplandı.

Histopatolojik incelemeler ve lezyon alanının hesaplanması Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı'nda, çalışmada uygulanan tedavileri, tedavi gruplarını ve deneklerdeki nörolojik değerlendirme sonuçlarını bilmeyen bir histoloji uzmanı tarafından yapıldı.

İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldı ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda *Kruskal-Wallis*, bunu izleyen *Mann-Whitney U* testleri kullanıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Deney protokolümüzün şematik görünümü

	Grup APC30	Grup SF	Grup APC akut	Grup APC 6	Grup APC 12
0.gün	Eter anestezisi uygulandı				
	APC				
	Laminektomi	Laminektomi + spinal kord travması			
		SF	APC	6. saatte APC	12. saatte APC
	Antibiyotik uygulaması				
1. gün	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması Antibiyotik uygulaması				
2. gün	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması Antibiyotik uygulaması				
3. gün	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması Antibiyotik uygulaması				
1. hafta	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması				
2. hafta	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması				
3. hafta	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması				
4. hafta	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması				
5. hafta	BBB skoruması 12 saatte bir mesane boşaltılması Sakrifikasyon				

BULGULAR

Laminektomi grubunda 2, diğer gruplarda 6 denek olmak üzere, altı grupta toplam 32 denek kullanıldı.

Grup APC30'dan 1 denek postoperatif 14.günde yara yeri enfeksiyonu, Grup SF'den 1 denek postoperatif 30.gün ve Grup APC akut'tan 1 denek postoperatif 30. Gün sağ arka ayaklarında gelişen enfeksiyon Grup APC 6'dan 1 denek postoperatif 24.gün yara yeri, 1 denek postoperatif 30.gün boğaz altında enfeksiyon, Grup APC 12'den 1 denek postoperatif 28.günde sol gluteal bölge de enfeksiyon sonucu kaybedildi.

Vücut Ağırlıkları

Gruplar arasında vücut ağırlıklarının ortalamalarının karşılaştırılmasında; anlamlı fark bulunmadı (p=0.05)

Tablo 4: Deneklerin vücut ağırlık ortalamaları (gram) Ort± SS

GRUP	VÜCUT AĞIRLIKLARI (gram)
Grup APC 30	236,00 ± 4,18
Grup SF	241,00 ± 5,47
Grup APC akut	234,00 ± 4,18
Grup APC 6	241,50 ± 2,64
Grup APC 12	245,80 ± 3,56

BBB Skorları

Tüm grupların BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında; 1., 2., 3., 7. 14., ve 21 günlerde istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla p=0,320, p=0,114, p=0,093, p=0,123, p=0,325, p=0,79).

Gruplar arasında 28. gün BBB skorları ortalama değerleri; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında; Grup SF BBB

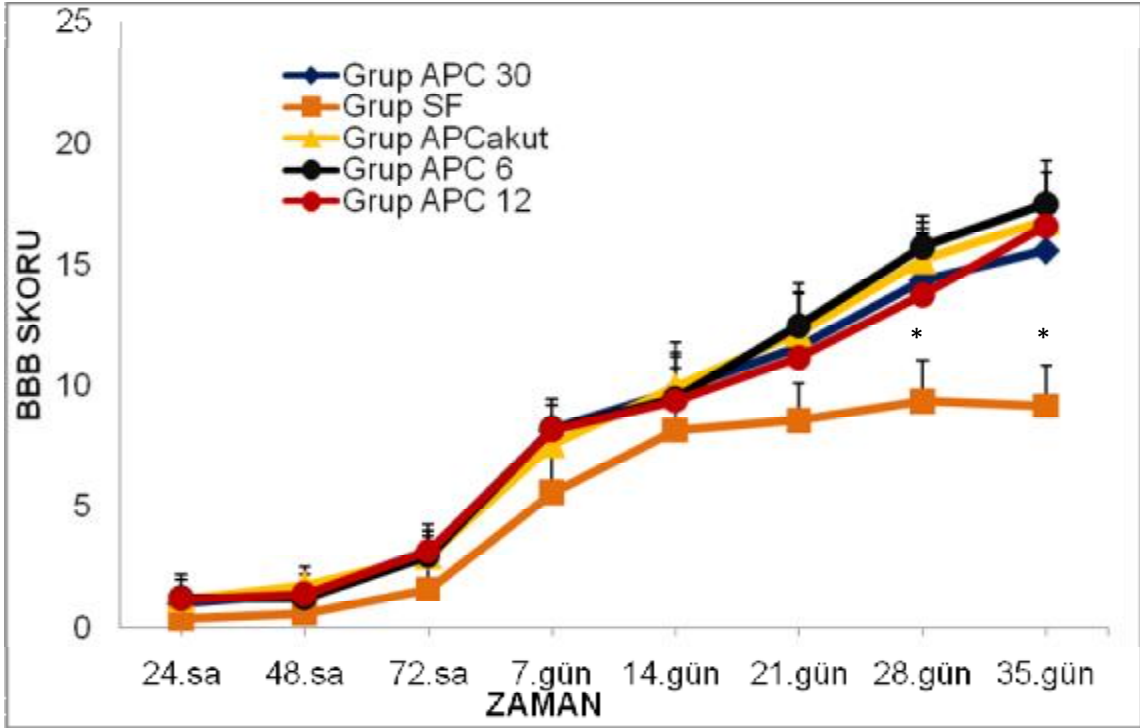
skorları ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.008$ $p=0.016$ $p=0.032$). Grup APC 30 ile Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.548$, $p=0.413$, $p=0.690$). Grup APC ile Grup APC 6 Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.556$, $p=0.548$). Grup APC 6 ile Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.556$).

Gruplar arasında 35. gün BBB skorları ortalama değerleri Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında; Grup SF BBB skorları ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0.008$ $p=0.008$ $p=0.016$ $p=0.008$).Grup APC 30 ile Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.690$ $p=0.556$ $p=0.421$). Grup APC ile Grup APC 6, Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.413$ $p=0.690$). Grup APC 6 ile Grup APC 12 BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi ($p=0.556$).

Tablo 5: Zamanlara göre *Basso*, *Beattie*, *Bresnahan* skorları ortalama değerleri Ort± SS

BBB skorları/ gün	Grup APC30	Grup SF	Grup APCakut	Grup APC 6	Grup APC12
BBB skoru 1	1,00±1,00	0,40±0,54	1,20±0,44	1,25±0,95	1,20±0,44
BBB skoru 2	1,40±1,14	0,60±0,54	1,80±0,44	1,25±0,50	1,40±0,54
BBB skoru 3	3,20±1,09	1,60±0,89	3,00±0,00	3,00±0,81	3,20±0,83
BBB skoru 7	8,20±1,30	5,60±2,40	7,60±0,89	8,25±0,95	8,20±0,44
BBB skoru 14	9,80±2,04	8,20±1,09	10,00±1,41	9,50±1,73	9,40±1,34
BBB skoru 21	11,60±2,30	8,60±1,51	12,20±1,64	12,50±1,73	11,20±2,68
BBB skoru 28	14,40±2,07	9,40±1,67*	15,20±1,09	15,75±1,25	13,80±2,94
BBB skoru 35	15,60±3,20	9,20±1,64*	16,80±0,44	17,50±1,29	16,60±2,70

* $p<0,05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı düşük



Grafik 1. Grupların Basso, Beattie, Bresnahan skorları ortalama değerleri

* $p < 0,05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı düşük

Histolojik Bulgular

Grup SF deneklerine ait spinal cord kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının bozulduğu, nöron sayısının azaldığı ve hücre yapısının net izlenemediği, glial hücre reaksiyonu ve yaygın demiyelinizasyon bulguları gözlenmiştir.

Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 deneklerine ait spinal cord kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının daha net izlendiği, glial hücre sayısının daha az ve nöron sayısının daha fazla olduğu, myelin ve akson yapısının daha iyi korunduğu görülmüştür

Grupların sağlam nöron sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 arasında; Grup SF ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.008$, $p=0.016$, $p=0.008$). Grup APC 30 ile Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 sağlam nöron sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.095$, $p=0.32$, $p=0.56$). Grup APC ile Grup APC 6, Grup APC 12 sağlam nöron sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.413$, $p=0.690$). Grup APC 6

ile Grup APC 12 sağlam nöron sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.730$).

Tablo 6: Grupların nöron sayıları ortalama değerleri Ort± SS

GRUP	NÖRON SAYISI
Grup APC 30	1,64 ± 0,54
Grup SF	1,20 ± 1,00*
Grup APC akut	1,56 ± 0,54
Grup APC 6	1,52 ± 0,50
Grup APC 12	1,54 ± 0,54

* $p<0.05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı düşük

Gruplar arasında glial hücre sayıları ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 arasında Grup SF ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.008$ $p=0.016$ $p=0.008$). Grup APC 30 ile Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 glial hücre sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.548$, $p=0.413$, $p=0.841$). Grup APC ile Grup APC 6 Grup APC 12 glial hücre sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.286$, $p=0.841$). Grup APC 6 ile Grup APC 12 sağlam nöron sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.286$).

Tablo 7: Grupların glial hücre sayıları ortalama değerleri Ort± SS

GRUP	GLİAL HÜCRE SAYISI
Grup APC 30	8,72 ± 0,87
Grup SF	12,7 ± 0,76*
Grup APC akut	8,87 ± 0,75
Grup APC 6	9,25 ± 0,59
Grup APC 12	8,72± 0,78

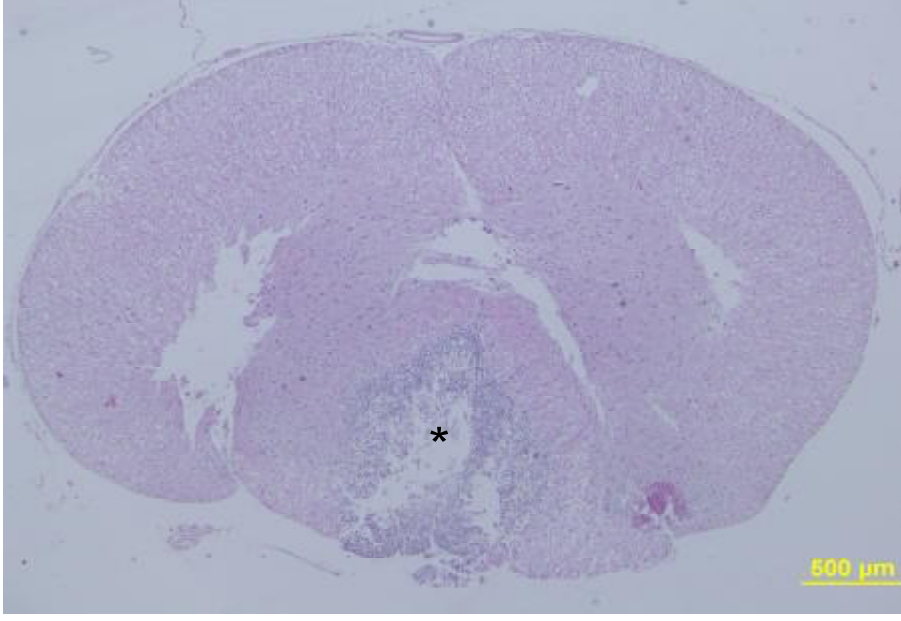
* $p<0.05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı yüksek

Gruplar arasında myelinli akson sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 arasında Grup SF ortalama değerleri anlamlı dūřuk bulundu (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.008$, $p=0.016$ $p=0.008$). Grup APC 30 ile Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 myelinli akson sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=1.000$, $p=0.905$, $p=0.151$). Grup APC ile Grup APC 6 Grup APC 12 myelinli akson sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.905$, $p=0.310$). Grup APC 6 ile Grup APC 12 myelinli akson sayısı ortalama değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.730$).

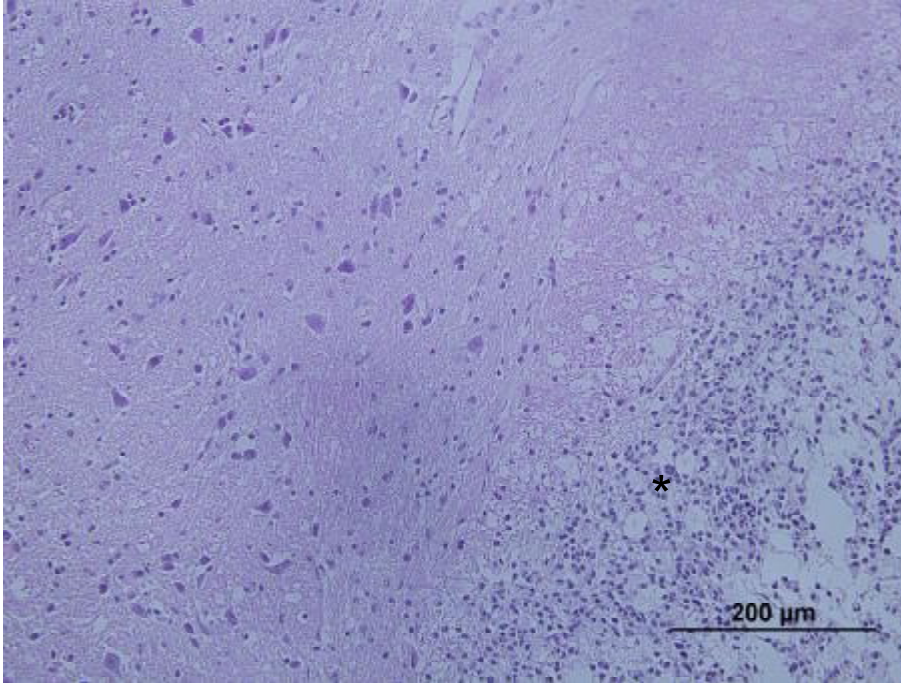
Tablo 8: Grupların myelinli akson sayıları ortalama değerleri Ort \pm SS

<i>GRUP</i>	<i>MYELİNLİ AKSON SAYISI</i>
Grup APC 30	19,14 \pm 0,73
Grup SF	16,26 \pm 0,23*
Grup APC akut	19,10 \pm 0,81
Grup APC 6	18,95 \pm 0,88
Grup APC 12	18,68 \pm 0,35

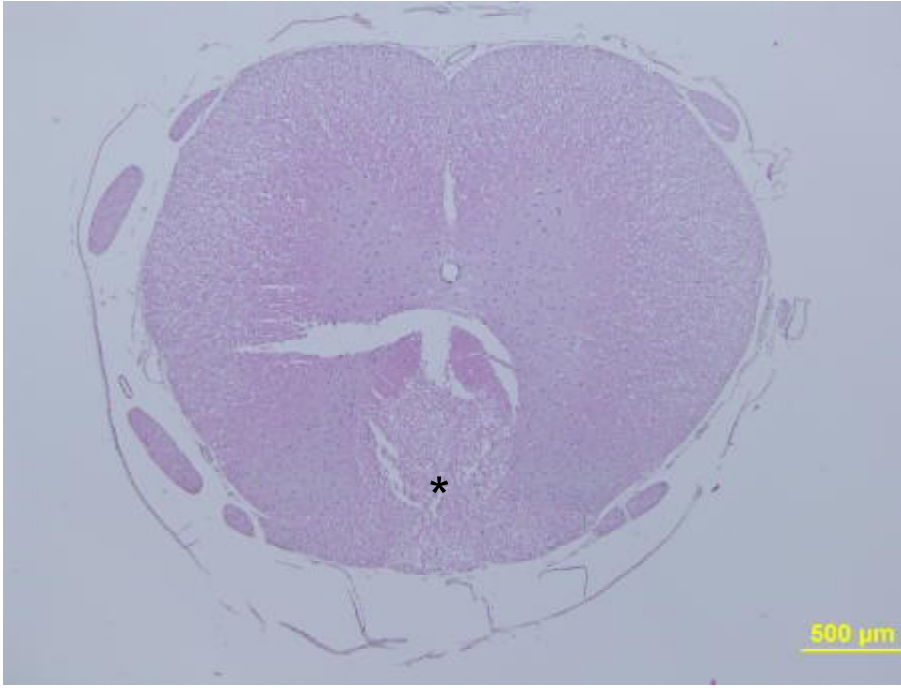
* $p<0.05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı dūřuk



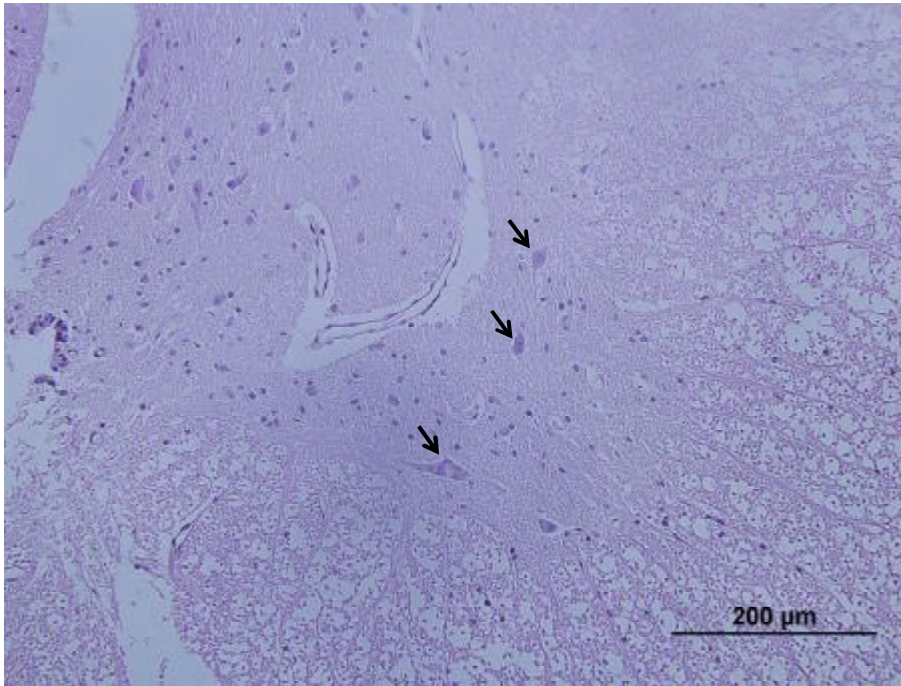
Resim 1: SF grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı (•) görüntüsü.(H-Ex40 büyütme)



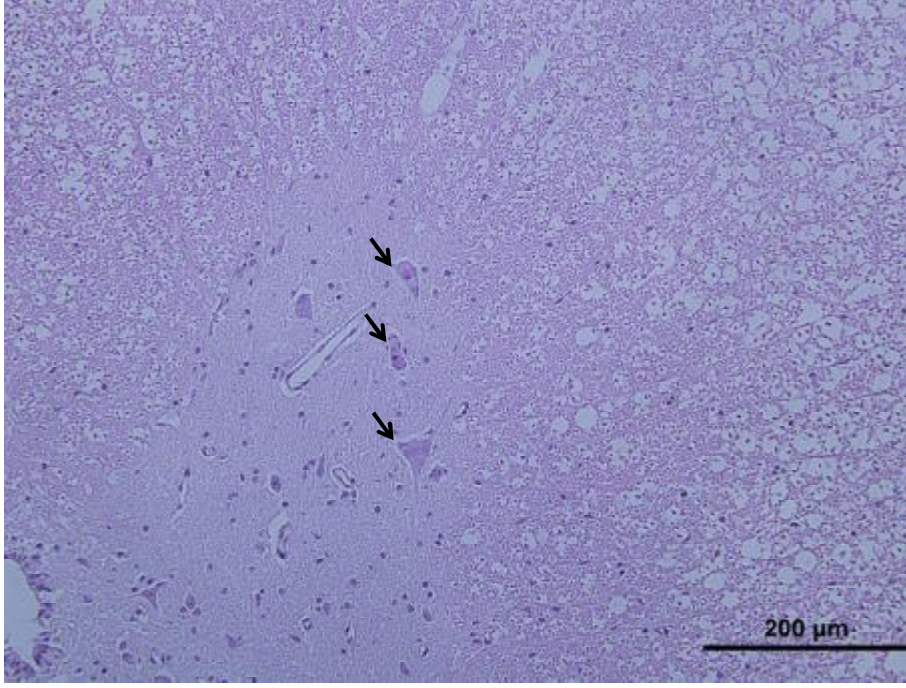
Resim 2: SF grubunda 2.denekten alınan kesitte görülen glial hücre artışı (•) (H-Ex100 büyütme)



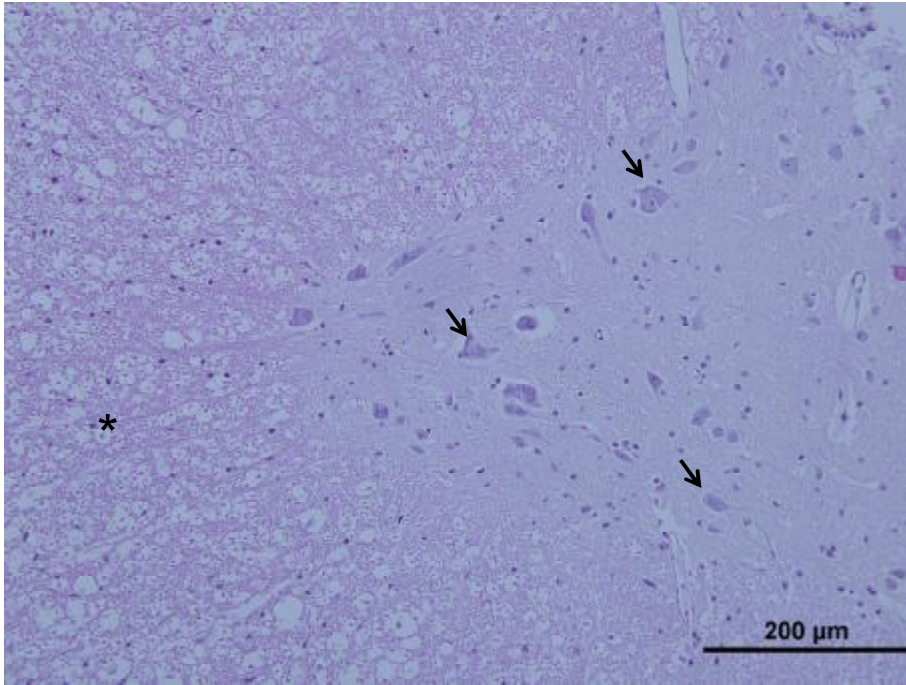
Resim 3: APC 30 grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı görüntüsü (•) (H-Ex40 büyütme)



Resim 4: APC akut grubundan bir deneğe ait sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme)



Resim 5: APC 6 grubundan bir deneğe ait belirgin ve sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme)



Resim 6: APC 12 grubundan bir deneğe ait belirgin glial hücelere oranla daha fazla ve sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme)

TARTIŞMA

Bu çalışmada spinal travma modeli oluşturulan ratlarda farklı zamanlarda iv uygulanan APC'nin 5.hafta sonunda motor fonksiyonları düzelttiği, nöron ve miyelinli aksonları koruduğu, glial hücre oluşumunu da azalttığını saptadık.

Çalışmada, temin edilmesinin kolay olması ve özel donanımlı laboratuvar koşullarına gereksinim göstermemesi nedeniyle Wistar Albino türü ratlar tercih edildi. Özellikle manuel masaj yapılarak mesane boşaltılmasına olanak verdiği için dişi rat kullanımı tercih edildi.

Spinal travma oluşturulmasında standardizasyonu sağlayabilmek için *Rivlin ve Tator* tarafından tarif edilen klip kompresyon modeli uygulandı (24). Bu modelde 63 g kapanma basıncı uygulayan anevrizma klibi (*Aesculap* FE 721K) kullanıldı ve kliplene süresi 1dakika olarak belirlendi. *Poon* ve ark. (71) yaptıkları çalışmalarında klip kapanma basıncı ve klip bası süresinin artırılmasının spinal hasarın şiddetini artırdığı, kapanma basıncı 50 g olan klibin şiddetli hasar oluşturduğu ve BBB skorları ile korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. *Pearse* ve ark. (72) farklı şiddette (hafif, orta, ağır olmak üzere) spinal kord travması uyguladıkları ratlarda travma şiddeti ile BBB skorlaması ve nöron kaybı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Aynı çalışmada travmanın şiddeti ile myelinli akson sayısında azalma arasında da anlamlı farklılık bulunmuştur. *Gensel* ve ark.(73) ise ağırlık düşürme yöntemiyle hafif ve orta derecede servikal spinal travma uyguladıkları ratlardan 6.hafta sonunda hafif şiddette hasarlanma olanlarda lökomotor aktivitede tamamen iyileşme saptarlarken orta derecede hasarlanma olanlarda ancak %30 bir iyileşme saptayabilmişlerdir. Lezyon alanları karşılaştırıldığında travma şiddetiyle lezyon alanları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Motor nöron kaybı açısından kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar oluşmuş ancak travma grupları arasında anlamlı farklılık oluşmadığı görülmüştür.

Spinal kord travmasını takiben oluşan nörolojik hasar, yaralanma sonrası birinci saatten birinci haftaya kadar artma gösterebilir. Travma modeline uygun güvenilir bir test protokolü kullanılması, spinal kord yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek açısından önemlidir (67). Ayrıca davranışsal testler, deneysel spinal kord yaralanmalarının zaman içerisinde spontan fonksiyonel iyileşmeyi de içeren sonuçlarını ve farklı tedavilerin etkilerini saptamada önemli araçlardır (74). Bu

çalışmada, oluşturulan spinal kord hasarının şiddetini ve APC'nin lökomotor aktiviteye nöroprotektif etkisini BBB davranış testi ile değerlendirdik.

Bu çalışmamızda tüm gruplarda, BBB skorları 1. gün ölçümlerinin karşılaştırılmasında denekler arası anlamlı fark bulunmaması, uygulanan travmanın şiddetinin eşit olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda APC'nin erken dönemde motor fonksiyonlarda belirgin gelişme oluşturmadığı ancak 28. günden sonra motor fonksiyonlarda belirgin düzelme oluşturduğu saptandı. Bu bulgumuz *Taoka* ve ark. (12) ve Güler ve ark. (75) ağırlık düşürme tekniğiyle spinal kord hasarı oluşturdukları çalışmalarındaki sonuçlar ile uyumsuz olmuştur. Bu uyumsuzluğun nedeninin *Taoka* ve ark.(12) ve Güler ve ark. (75) oluşturdukları spinal travmanın farklı modelde, farklı şiddette olması ve bunun sonucunda fonksiyonel gelişmenin daha hızlı ve erken dönemde başlamış olmasına bağlıyoruz.

Aktive Protein C'nin antiinflamatuvar, antitrombotik ve profibrinolitik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Antitrombotik etkisi özellikle mikrosirkulasyon açısından önem taşır (56). PC ve trombomodulin seviyelerindeki azalma inflamasyon ve koagulasyon siklusunu başlatır. *Murakami* ve ark. (60) inflamasyon ve koagulasyon cevaplarını çeşitli mekanizmalarla baskıladığı ve IL-1 ve TNF- α gibi sitokinleri azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda monositlerin APC ile inkübasyonunun TNF- α üretiminde azalma, translokasyon blokajı ve lipopolisakkaritlere cevaben ortaya çıkan inflamasyon öncesi nükleer transkripsiyon faktör aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (76). Deneysel çalışmalarda APC, PAI-I'i inhibe ederek ve TAFI sınırlandırarak endojen fibrinolitik yolu hızlandırır (59). *Uchiba* ve ark. (77) yaptığı bir çalışmada; doğal bir antikoagulan olan APC'nin endotel hücrelerindeki mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAPK) yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. MAPK yolu endotel hücrelerde etkili olduğundan APC'nin de endotel hücre proliferasyonunu uyararak anjiogenezise yol açması mümkün olabilir. APC'nin bu anjiogenetik (damarlanmayı arttırıcı) aktivitesi antitrombotik aktivitesine ek olarak mikrosirkulasyonun düzenlenmesinde katkı sağlayabilir. APC endotel, monosit, nötrofil, eosinofil ve respiratuar epitel hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak direkt antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki gösterebilir (78).

Daha önceki çalışmalarda APC intravenöz olarak 100 µg/kg ve 25 IU/kg dozlarında uygulanmıştır (12, 79). Bu çalışmada uyguladığımız APC dozları pubmedde ulaşabildiğimiz literatürle uyumlu olarak 100 µg/kg aktive Drotrekogin alfa (XIGRIS®) intravenöz şeklinde olmuştur.

Bu çalışmada APC'nin nöron kaybını azalttığını histopatolojik olarak ışık mikroskopik görüntülerle saptadık. APC'nin antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisinden dolayı nöron kaybını azalttığını düşünüyoruz (78). Benzer şekilde *Taoka* ve ark. (12) travma öncesi ve sonrası APC verilen grupta kontrol grubuna göre nörolojik skorlarda anlamlı yükseklik bulmuşlardır. Hasarlı spinal kord dokusunda travma öncesi APC verilen grupta nötrofil toplanmasını myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi artışıyla değerlendirilmiştir. Travma öncesi APC uygulanan grupta MPO aktivitesi düşük diğer gruplarda yüksek saptanmıştır.

Travmadan 4 saat sonra travma öncesi, travma sonrası APC verilen ve lökopeni gruplarında hasarlı dokuda TNF-α seviyesinde anlamlı düşük bulunmuştur. Sonuçta nöron kaybının azalmasını APC'nin antiinflamatuvar etkisine bağlamışlardır.

Taoka ve ark.'larının (79) yaptığı diğer bir çalışmada ise; 8 hafta boyunca yapılan değerlendirmede motor disfonksiyonda ve 7 hafta süresince elektrofizyolojik testlerde APC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma saptanmıştır. Bu yararlı etkinin APC'nin antikoagülan özelliğinden ziyade antiinflamatuvar özelliğine bağlı olabileceği belirtilmektedir (79). Bu çalışmada APC'nin antiinflamatuvar etkisi için iki mekanizma öne sürülmektedir. İlk olarak nötrofillerin toplanmasını ve monositlerin sitokin üretimini azaltarak nötrofillerin aktivasyonunu inhibe ettiği ikinci olarak ise endotelial hücre reseptörlerine inflamatuvar mediyatör cevabını azalttığı düşünülmektedir. Bu etkilerle APC'nin travmaya bağlı spinal kord hasarının sekonder etkilerini önleyebileceği sonucuna varılmıştır (79).

Yeşilirmak ve ark.(80) deneysel olarak hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan neonatal ratlarda APC'nin antiapoptotik etkiyle nöron kaybını azalttığını bildirmişlerdir.

Ayrıca bu çalışmada APC'nin hasar alanında myelin kaybını da azalttığı saptandı. Geç dönem lezyonun önemli bir komponentinin myelin kaybı olduğu bilinmektedir (38). Orta şiddette oluşturulan travmalarda akson devamlılığının

korunduğu, bununla birlikte selektif demiyelinizasyon olduğu gösterilmiştir (38). Burada şiddetli bir travma oluşturulmasına karşın APC myelin kaybını azaltmıştır. Bu bulgu Güler ve ark. (75) ağırlık dűřürme ile oluşturdukları spinal travma modelinde APC'nin myelin kaybını azalttığını bildirdikleri çalışma sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Kronik fazda lezyon bölgesinin rostral ve kaudalinde dejeneratif ve rejeneratif olaylar gelişir. PNL azalırken, makrofajların sayısı giderek artar. Makrofajlar yaralanma bölgesindeki hücresel artık, miyelin ve eritrositleri fagosite eder. Astrositik ve fibrotik bir skar dokusu oluşur. Arka köklerde amputasyon nöromaları oluşur. Nekrotik bölge, kist formasyonu veya posttravmatik siringomiyeliye dönüşebilir. Kronik dönemde görülen diğer patolojik olaylar kistik miyelomalazi, Wallerian dejenerasyon skar, gliozis, araknoidit ve atrofi şeklinde sıralanabilir (34).

Biz de bu çalışmada APC'nin glial hücre sayısının artmasını engellediğini saptadık.

Sonuç olarak; bu çalışmada elde edilen veriler bize; klip kompresyon yöntemiyle deneysel spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda erken dönemde APC'nin belirgin nörodavranışsal iyleşme sağlamadığını ancak uzun dönemde motor fonksiyonları düzelttiğini ve bununla beraber nöron ve miyelinli aksonları koruduğunu, glial hücre oluşumunu azalttığını göstermiştir.

SONUÇLAR

Buna göre; çalışmamızda erken dönem nörodavranışsal değerlendirmede belirgin iyileşme görülmemesi farklı deneysel spinal kord hasarı oluşturulmasına ve travmanın şiddetinin farklı olmasına bağlı olabilir. Denek sayısı artırılarak oluşturduğumuz farklı deneysel spinal kord hasarlanması sonrasında APC' nin erken dönem patolojik değişikliklere etkisinin değerlendirilmesi sağlanabilir.

Çalışmada ilacın lökomotor aktivitelerde iyileşme üzerine olan etkisi birden fazla nörodavranışsal testle değerlendirilebilir.

Bu çalışmada tercih edilen yöntemle oluşturulan APC' nin antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerine aracılık eden sitokinler ve reseptörler araştırılabilir.

APC' nin deneysel spinal kord hasarı sonrası subakut ve kronik dönemde nörodavranışsal düzelmede antiapoptotik etkisinin rolünü belirlemek için elektron mikroskopik inceleme ve immün histokimyasal değerlendirme yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Simon CM, Sharif S, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma*. 2009 Apr;26(4):563-74.
2. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*. 2004 Jul-Aug;4(4):451-64.
3. Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine* . 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S47-54.
4. Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, Tetzlaff W. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*. 2005 Sep 1;30(17 Suppl):S3-13.
5. Tator CH, Fehlings MG: Review of secondary injury theory of acute spinalcord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991 Jul;75(1):15-26.
6. Barut Ş, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, et al. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev*. 1993;16(1):53-9.
7. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol*. 2001 Sep-Oct;24(5):265-79.
8. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998 Oct;56(3):341-58.
9. Yamaguchi Y, Hisama N, Okajima K, Uchiba M, et al. Pretreatment with activated protein C or active human urinary thrombomodulin attenuates the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion in rat liver. *Hepatology*. 1997;25:1136-40.

10. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.
11. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, et al. Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood*. 1996;15;87(2):642-7.
12. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, et al. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci*. 1998 Feb 15;18(4):1393-8.
13. Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian R. Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Curr Opin Neurol*. 2002 Dec;15(6):713-20.
14. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* . 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S2-12.
15. Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sümbüloğlu G, et al. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord* 2000 Nov;38(11):697-701.
16. Xarchas K, Bourandas J. Injuries and disease of the Spine in ancient times. *Spine* 2003; 28(13):1481-1484.
17. Agrawal SK, Fehlings MG: Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons invitro: Role of Na, Na-K ATPase, the NA-H exchanger and the Na-Ca exchanger. *J.Neuroscience*. 1996 Jan15; 16 (2): 545-52.
18. İplikçioglu C. Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Omurilik Omurga Cerrahisi, Ed. M.Zileli, Fahir Özer, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık 1. Baskı 2002; 459-465,
19. Marketos SG, Skiadas P: Hippocrates. *Spine* 1999; 24:1381-1391.

20. Sonntag VKH. History of degenerative and traumatic disease of the spine. In a history of neurosurgery. Greenblat SH. American Association of Neurological Surgeons 1997; pp 355-357.
21. Çavdar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi. Omurilik ve Omurga Cerrahisi Ed. M.Zileli ve A.Fahir Özer, İzmir, Meta basım 2.baskı 2002; 15-17.
22. Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body an yahoo education.Philadelphia: Lea& Febiger,1918, Newyork Bartleby.com.2000.
23. Gülmen V, Zileli M. Deneysel omurilik yaralanması. Omurilik ve Omurga Cerrahisi Ed. M.Zileli ve A.Fahir Özer, İzmir, Meta basım 2.baskı 2002; 951-956.
24. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. Surg Neurol. 1978 Jul;10(1):38-43.
25. Kaptanoğlu, E. Omurilik Yaralanmaları Sonrası Nöral Korunma Stratejileri. Omurilik Ve Omurga Cerrahisi Ed. M.Zileli ve A.Fahir Özer, İzmir, Meta basım 2.baskı 2002; 813.
26. Tator CH in. Wilkins RH, Rengachary SS (ed): Neurosurgery. McGraw-Hill, 2 nd edition 1996; pp2847-2859.
27. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurgery. 1999 May;44(5):1027-39.
28. Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. J Emerg Med. 1993;11 Suppl 1:13-22.
29. Bligt AR, Young W. Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by schwan cells. J Neurol Sci 1989; 91: 15-34.

30. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J. Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. *Clin Neuropharmacol.* 2001 Sep-Oct;24(5):254-64. 2001; 24(5):254-264.
31. Geisler FH: Neuroprotection and regeneration of the spinal cord, in Menezes AH, Sonntag VKH (eds): *Principles of spinal surgery*, New York, McGraw-Hill, 1996;769-784.
32. Koyonagi I, Tator CH, Lea PJ. Silicone rubber microangiography of acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1993 Feb;32: 260-8.
33. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal. *2004 NeuroRx.* 2004 Jan;1(1):80-100.
34. Güzel A., Tatlı M, , Ökten Aİ, Çaylı S. Omurilik Yaralanmasının Patoloji Ve Fizyopatolojisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2006; 28(2): 73 – 78.
35. Stefan Klussmann, Ana Martin-Villalba. Molecular targets in spinal cord injury. *J Mol Med.* 2005 Sep;83(9):657-71.
36. Hall E, Wolf D, Braugher J. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg.* 1984 Jul;61(1):124-30.
37. Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, et al. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):821-7.
38. Guizar –Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, et al: Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats subjected to severe spinal cord contusion. *Surg Neurol.* 1994 Mar;41(3):241-9.
39. Shi R, Pryor JD. Pathological changes of isolated spinal cord axons in response to mechanical stretch. *Neuroscience.* 2002;110(4):765-77.

40. Schnell L, Fearn S, Klassen H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1999 Oct;11(10):3648-58.
41. Saville LR, Pospisil CH, Mawhinney LA. A monoclonal antibody to CD11d reduces the inflammatory infiltrate into the injured spinal cord: a potential neuroprotective treatment. *J Neuroimmunol*. 2004 Nov;156(1-2):42-57.
42. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*. 2004 Jun;21(6):754-74.
43. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006 Mar-Apr;23(3-4):264-80.
44. Casha S, Yu, WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*. 2001;103(1):203-18.
45. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*. 1997 Jan 20;377(3):443-64.
46. Popovich, PG. Immunological regulation of neuronal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Prog Brain Res*. 2000;128: 43–58.
47. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine*. 2004 May 1;29(9):966-7.
48. Buss A, Brook G.A, Kakulas B, et al. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*. 2004 Jan;127(Pt 1):34-44.

49. Wingerd BD. Rat dissection manual. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, London. 1999:5-40.
50. Tatlı M, Güzel A., Ökten Aİ, Çaylı S. Omurilik yaralanmalarının medikal tedavisi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 27: 165-172.
51. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway Blood. 2007 Apr 15;109(8):3161-72.
52. Macias WL, Yan SB, Williams MD, et al., New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). Crit Care. 2005;9 Suppl 4:S38-45.
53. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, et al: Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. Am J Respir Crit Care Med. 2003 May 15;167(10):1416-26.
54. Esmon CT, Glass JD. The APCs of neuroprotection. J Clin Invest. 2009 Nov;119(11):3205-7.
55. Waugh JM, Li-Hawkins J, Yuksel E, Kua MD, et al: Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation. Circulation. 2000 Jul 18;102(3):332-7.
56. Esmon CT. The normal role of Activated Protein C in maintaining homeostasis and its relevance to critical illness. Crit Care. 2001;5(2):S7-12.
57. Dhainaut JF, Yan SB, Margolis BD, Lorente JA, et al. PROWESS Sepsis Study Group: Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis. Thromb Haemost. 2003 Oct;90(4):642-53.
58. Derhaschnig U, Reiter R, Knobl P, Baumgartner M, et al. Recombinant human activated protein C (rhAPC; Drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. Blood. 2003 Sep 15; 102(6):2093-2098.

59. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB: The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):2093-100.
60. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, et al. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol*. 1997 Feb;272(2 Pt 1):L197-202.
61. Laterre PF, Heiselman D. Management of patients with severe sepsis, treated by drotrecogin alfa (activated). *Am J Surg*. 2002 Dec;184(6A Suppl):S39-46.
62. Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005 Apr;3(2):119-31
63. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*. 2003 Mar;9(3):338-42.
64. Jackson CJ, Xue M. Activated protein C—An anticoagulant that does more than stop clots. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(12):2692-7.
65. Basso, DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995 Feb;12(1):1-21.
66. Basso, DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *J Neurotrauma*. 1996 Jul;13(7):343-59.
67. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma*. 2002 Oct;19(10):1251-60.
68. Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, et al. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. *J Neurosurg*. 2002 Jul;97(1 Suppl):142-7.

69. Basso DM. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J Neurotrauma*. 2004 Apr;21(4):395-404.
70. Koopmans GC, Deumens R, Honig WM, Hamers FPT, et al. The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination. *J Neurotrauma*. 2005 Feb;22(2):214-25.
71. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine*. 2007 Dec 1;32(25):2853-9
72. Pearse DD., Lo TP., et al. Histopathological and Behavioral Characterization of a Novel Cervical Spinal Cord Displacement Contusion Injury in the Rat. *J Neurotrauma*. 2005 Jun;22(6):680-702.
73. Gensel JC, Tovar CA, Hamers FP. et al. Behavioral and Histological Characterization of Unilateral Cervical Spinal Cord Contusion Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2006 Jan;23(1):36-54 2006. 23(1): 336-54.
74. Cayli, S.R., et al. Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci*. 2006 Jun;24(4):233-9.
75. Uzmanlık tezi. Güler D., Omurilik Yaralanma Modelinde Drotrekogin Alfa (Aktive Protein C)' nin Etkisinin Morfometrik Ve Ultrastrüktürel Analizi. 2006. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
76. Whete B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation, TNF- α production in the monocytic cell line. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):130-4.
77. Uchiba M, Okajima K, Suda T, Fukudome K, et al. Activated Protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen- activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res*. 2004 Jul 9;95(1):34-41.

78. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, et al. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 May 15;167(10):1416-26.

79. Taoka Y, Schlag MG, Hopf R, Redl H. The long-term effects of pre-treatment with activated protein C in a rat model of compression-induced spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2000 Dec;38(12):754-61.

80. Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res.* 2008 May 19; 1210:56-62.


Toplantı No : 08/16/2009
Toplantı Tarihi : 28 Ağustos 2009

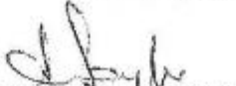
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,


57/2009 Protokol No'lu; Anesteziyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı doktorlarından Ebru POLAT'ın yürütücüsü olduğu "Ratlarda oluşturulan medulla spinalis travma modelinde İn Yolla Uygulanan aktive protein C'nin etkisinin araştırılması" isimli projede;
Dişi hayvan seçilmesi gerekmektedir.


Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.


Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

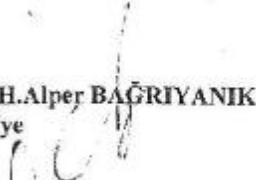

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı



Doç. Dr. Alper SOYLU
Üye


Doç. Dr. Hüseyin ASTARCI OĞLU
Üye


Doç. Dr. Abdullah KUMRAL
Üye


Doç. Dr. Yücel ARISOY
Üye (katılmadı)

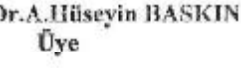

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
Üye

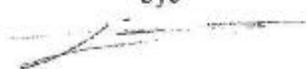

Vtr. Dr. Adnan SERPEN
Üye


Doç. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı
(Araştırıcı)

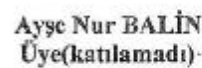

Prof. Dr. Ayşe GELAL
Üye


Doç. Dr. Turhan İLKNUR
Üye


Doç. Dr. A. Hüseyin BASKIN
Üye


Doç. Dr. Tonay İNCEBOZ
Üye


Doç. Dr. O. Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye (katılmadı)


Ayşe Nur BALIN
Üye (katılmadı)